



# Contributions de l'ornithine aminotransférase dans les réponses physiologiques aux contraintes métaboliques chez la souris

Benjamin Ladeux

## ► To cite this version:

Benjamin Ladeux. Contributions de l'ornithine aminotransférase dans les réponses physiologiques aux contraintes métaboliques chez la souris. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10113 . tel-01175607

**HAL Id: tel-01175607**

**<https://theses.hal.science/tel-01175607>**

Submitted on 10 Jul 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON  
Délivrée par  
L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1  
L'ÉCOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCE ET SANTÉ  
DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 7 août 2006)

Discipline : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement le 12 Juillet 2013

par **Benjamin LADEUX**

**Contributions de l'ornithine aminotransférase dans les réponses physiologiques aux  
contraintes métaboliques chez la souris**

Sous la direction du Dr. Olivier LEVILLAIN et du Dr. Mireille RACCURT

Composition du jury :

M. Claude DUCHAMP, <i>PU, Université Claude Bernard, Lyon 1</i>	Président
M. Jean DEMARQUOY, <i>PU, Université de Bourgogne, Dijon</i>	Rapporteur
Mme Christine PERRET, <i>DR, Institut Cochin, Paris</i>	Rapporteur
M. Didier RÉMOND, <i>CR, Université Clermont 1, St-Genès Champanelle</i>	Rapporteur
Mme Hélène SIMONNET, <i>MCU, Université Claude Bernard, Lyon 1</i>	Examineur
Mme Mireille RACCURT, <i>IR1 CNRS, Université Claude Bernard, Lyon 1</i>	Co-directeur



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

## **M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie  
Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Directeur : M. N. SIAUVE

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : Mme S. FLECK

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE





## REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'ex UMR 5123 « Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire » puis au sein de l'IBCP et enfin au sein de l'UMR 5023 « Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés ». Je ne serais jamais arrivé au bout de ce travail sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes que je tiens à remercier chaleureusement.

Tout d'abord, je tiens à remercier le **Dr. Olivier Levillain** qui m'a permis de réaliser mon M2 et cette thèse avec lui. Merci de m'avoir fait confiance tout au long de ces 4 ans, de m'avoir transmis votre passion pour les acides aminés, ces « petites briques » indispensables à la vie, ainsi que pour l'OAT. Merci pour votre patience de tous les jours et pour nos discussions sur le rôle de cette « super » enzyme.

Je voudrais remercier le **Pr. Jean Demarquoy**, le **Dr. Christine Perret**, le **Dr. Didier Remond**, ainsi que le **Dr. Hélène Simonnet** d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci pour vos remarques constructives et la discussion qui en a découlé. Cette discussion a permis de soulever de nouvelles pistes de réflexion et d'enrichir fortement le débat.

Je tiens à adresser un grand merci au **Pr. Claude Duchamp** qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Je tiens tout particulièrement à le remercier pour m'avoir accueilli dans son équipe au début de cette aventure. Je souhaite le remercier aussi pour son aide plus que précieuse dans la rédaction de ce manuscrit et des articles. Merci aussi pour vos précieux conseils et le temps consacré à la préparation du grand oral.

Je tiens à témoigner toute ma gratitude au **Dr. Mireille Raccurt**. Merci dans un premier temps pour ta gentillesse, ta disponibilité de tous les jours, ta bonne humeur, ton soutien et tes phrases parfois incongrues et inattendues mais toujours aussi drôles (impliquant un grand nombre de personnes et de la bière notamment...). Je voudrais te remercier d'avoir accepté la lourde tâche de m'accompagner dans la fin de cette thèse alors que les acides aminés n'étaient pas forcément ton dada et que tu avais d'autres choses à faire au départ. Ce fut un grand plaisir et honneur d'être le dernier « petit » qui a pu bénéficier de tes conseils et de tes connaissances pour la rédaction d'une thèse. Je n'oublierais jamais nos brain storming dans ton bureau pendant des heures à essayer de comprendre « à quoi pouvait bien servir cette enzyme !!! ». Je

tiens aussi à remercier **Jean-Paul** pour ses fameuses quenelles sauce nantua (humm un délice !!!) et les matchs de rugby avec le casse-croute qui va bien. Et promis, dans ma future carrière scientifique je ne ferais plus de comparaison mâle/femelle car comme tu m'as si souvent dit : « les femelles elles nous font ch\*\*r quand même !!! »

J'aimerais remercier le **Dr. Monique Touret** qui m'a accueilli au sein de son équipe pour partager ses connaissances et son savoir-faire en immuno. J'ai n'ai qu'un regret, c'est que nos manip n'aient pas fonctionnées et que nous n'ayons pas pu faire de jolies photos de nos cellules.

Je voudrais remercier aussi le **Dr. Isabelle Rogowski**, dont la porte du bureau était toujours ouverte pour m'accueillir et qui a eu la patience de répondre à mes nombreuses questions de statistiques, sachant que je partais de loin quand même. Merci pour votre disponibilité et votre patience.

Je souhaiterais remercier le **Dr. Bernard Verrier** qui nous a acceptés dans son équipe au sein de l'IBCP suite aux restructurations de l'ex UMR 5123.

Je souhaite aussi remercier toute l'équipe pédagogique de physiologie qui m'a permis de réaliser mon monitorat des de bonnes conditions, avec une mention spéciale au **Dr. Cyril Dégletagne** qui a partager certains TP avec moi et dont on se souviendra longtemps (les étudiants aussi je pense !!!).

J'adresse un grand merci à toutes les personnes (encore présentes ou non) de l'UMR 5123 et de l'UMR 5023 qui ont permis que cette thèse se déroule dans la joie et la bonne humeur. Merci à vous !!!

Merci à **Marie-Thérèse Boillon**, plus connue sous l'acronyme de MTB, ancienne secrétaire de l'équipe et capable de passer n'importe quelle commande n'importe quand. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur de tous les jours, ainsi que pour tes gâteaux et clafoutis toujours aussi bons.

Une petite dédicace aux 3 barbus de l'équipe, à savoir le **Dr. Harry Koubbi**, syndicaliste de première heure et cuisinier assez surprenant, le **Dr. Jean-Louis Rouanet**, spécialiste es canard et manchot, grand amateur de rugby et dont l'accent plein de soleil illuminait les tristes journées d'hiver, et enfin **Guy Dallevet**, ACO très à cheval sur les règles de sécurité (que j'ai

toujours scrupuleusement respectées...), artiste au grand cœur, et ayant toujours plein d'anecdotes passionnantes à raconter et dont on ne se lasse jamais.

Merci aux deux experts en mitochondries de l'équipe, le **Dr. Damien Roussel** dont l'objectif est de passer l'ensemble du règne animal dans un potter et dont les blagues sont aussi bonnes que les miennes... et le **Dr Caroline Romestaing** grande organisatrice du barbecue annuel et que je dérangeais souvent tard le soir au labo pour lui poser des questions assez surprenante lors de ma rédaction.

Merci au **Pr. Yann Voituron**, grand consommateur de Coca Co... (ah non pas de pubs !!!) et aux références cinématographiques impressionnantes. Merci de m'avoir accueilli dans ton équipe pour cette fin de thèse un peu mouvementée !

Une grosse dédicace à **Orély**, ma deuxième moitié de cerveau qui a subit mon « truc jaune » et mes « TOP » toutes les 20 secondes. Technicienne hors pair et grande blablateuse (plus que moi ce qui n'est pas peu dire) dont le sourire et le grain de folie ont animé les couloirs du 4<sup>ème</sup> étage, et à qui je souhaite plein de bonheur dans son nouveau labo.

Merci à nos quatre animalières de choc : **Sophie** dont les samossas nous ont régautés, **Julie** qui pensait presque toujours à préparer les rats de TP, **Angéline** que j'ai embêté plus d'un matin dans son bureau, et **Gladys** partenaire de pause clope sur la terrasse. Ne changez rien !

Un gros merci à celles et ceux que je venais embêter avec un « 11H30 ! J'ai faim ! On va au self ? » tous les jours. Merci à **Lara, Odile, Nath, Adeline** (et merci encore à vous quatre pour l'aide à la préparation du pot le jour J), Henry, Félix, Antonin et Ludo pour tous ces moments de franche rigolade autour de la table.

Je tiens aussi à remercier les étudiants passés et présents qui ont participé à la bonne humeur dans le laboratoire. Merci au **Dr. Maud Belouze** pour ton sourire permanent et la touche de couleur apportée par tes vêtements très colorés. Merci aux **Dr. Loic Teulier** et **Jérôme Prunier** pour les parties de coinches endiablées et les bières le soir au labo et promis Loic la prochaine fois on s'organise mieux pour la nuit du volley. Bonne chance pour vos post-docs. Une grosse dédicace au **Dr. Cyril Dégletagne**, danseur émérite, partenaire de nombreux « craquages » lors des manips et autres, et qui a réussi l'exploit de me faire apprécier la bio mol (si si c'est possible !!!). Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, les bonnes bouffes, les soirées et les folles parties de zombicide. Et merci aussi à ta chérie **Chloé** qui a accepté de te partager avec

moi... Bonne chance pour ton post-doc sur les « vieux bivalves ». Merci aux futurs diplômés : **Anaïs** (experte en casse-tête et bonnes bouffes), **Bérengère**, **Gaëlle** et **Sabine**. Tic-tac, tic-tac, le compte à rebours est lancé pour vous. Courage pour cette dernière ligne droite ! Merci à **PAX**, le petit dernier de l'équipe et dont l'esprit est aussi tordu que le mien !

Je voudrais adresser un immense remerciement à tous les autres qui ont été là tout au long de cette thèse. Je veux remercier dans un premier temps **mes parents** et **ma sœur** qui m'ont toujours encouragé et soutenu dans mes choix. Merci à **Juju** et **Laeti** de m'avoir supporté (et ce n'est pas un euphémisme, Juju ça fait plus de 10 ans pour toi et ça ne nous rajeuni pas!) durant toute ma thèse. Merci pour votre soutien, votre disponibilité à tout moment et les nombreuses fois où vous m'avez accueilli pour éviter tout « craquage intempestif ». Merci à **Edouard**, l'autre barbu de la promo, qui de binôme à coloc improvisé, a toujours suivi cette folle aventure de près avec de nombreux débriefings sur son avancée autour d'une bière ou dans un camion de déménagement pour l'autre bout de la France (on n'a pas encore fait le Sud !!!).

Enfin, je voudrais remercier tous ceux qui m'ont soutenu physiquement ou moralement durant ces 4 années d'aventure et que j'aurais oublié de citer ici.

Merci à vous tous !!!

## RESUME

Les acides aminés sont des molécules importantes pour la synthèse des protéines, la fourniture de substrats énergétiques ou la production de facteurs de régulation de l'activité cellulaire. L'ornithine aminotransférase (OAT) est une enzyme clef du métabolisme des acides aminés qui relie l'arginine, un acide aminé indispensable à la synthèse protéique au cours de la croissance, et le glutamate, la glutamine et l' $\alpha$ -cétooglutarate, qui peuvent être transformées en glucose.

Nous nous sommes principalement intéressés à la caractérisation biochimique de l'activité de l'OAT et à ses variations chez la souris, modèle pour lequel les données sont peu nombreuses. Nous avons utilisé deux contraintes physiologiques, le développement postnatal et l'exposition au froid, pour étudier les variations et les mécanismes de régulation de l'activité de l'OAT.

Au cours d'une première étude, nous avons caractérisé une activité OAT fonctionnelle dans tous les organes étudiés chez la souris mâle ou femelle adulte. Nous avons aussi démontré l'existence d'un dimorphisme sexuel de l'activité dans la plupart des organes étudiés avec une activité plus élevée chez la femelle que chez le mâle.

Dans une seconde étude, nous avons montré des variations organe et sexe spécifiques de l'activité OAT au cours du développement postnatal en réponse aux besoins spécifiques en acides aminés lors de la croissance, ainsi qu'une régulation de l'expression de l'OAT par la testostérone, le cortisol et le changement de régime alimentaire lors du sevrage. Nous avons ainsi mis en évidence une contribution potentielle importante et insoupçonnée jusque-là du muscle squelettique au métabolisme de l'ornithine chez les souriceaux.

Enfin, nous avons mis en évidence que l'exposition aigüe et chronique au froid augmente ou diminue l'activité OAT de façon tissu-spécifique en liaison avec les besoins énergétiques de l'organisme, et les rôles multiples des substrats générés par les différentes voies métaboliques de l'OAT.

Nos résultats montrent que l'activité OAT est modulée dans les différents organes en fonction des besoins en acides aminés, en substrats énergétiques ou en fonction des besoins de détoxification de l'organisme lors de contraintes métaboliques. Cela suggère un rôle important du métabolisme des acides aminés dans les réponses adaptatives des organismes à leur environnement.

# ABSTRACT

## **Ornithine aminotransferase contributions in physiological responses to metabolic constraints in mouse**

Amino acids are important molecules for protein synthesis, energetic substrates supply or production of cellular activity regulation proteins. Ornithine aminotransferase (OAT) is a key enzyme of amino acids metabolism linking arginine, an essential amino acid for protein synthesis during growth, and glutamate, glutamine and  $\alpha$ -ketoglutarate which could be converted into glucose.

We principally focused on biochemical characterization of OAT activity and its variations in the mouse, an animal model which is few documented. We used two physiological constraints, postnatal development and cold exposition, to study variations and regulation mechanisms of OAT activity.

During a first study, we characterized a functional OAT activity in all the males and females mice organs studied. We showed the existence of a sexual dimorphism of OAT activity in almost all the organs studied, with a higher OAT activity in females than in males.

In a second study, we showed that the variations of OAT activity were organ and sex specific during the postnatal development in response to the specific needs in amino acids during the growth. We linked these variations to the regulation of OAT expression by testosterone, cortisol and the change of the diet during weaning. We thus demonstrated an important and unsuspected contribution of skeletal muscles in pups' ornithine metabolism.

Finally, we showed that acute and chronic cold exposition modulates OAT activity in a tissue specific way, in relation with energetic needs and the multiple roles of the substrates generated by the metabolic pathways of OAT.

Our results show that in the different organs, OAT activity is modulated in function of amino acids needs, energetic substrates or detoxification needs of the organism during the different metabolic constraints. This is suggesting an important role for the amino acids metabolism in adaptive responses of organisms to their environment.

# Liste des publications et communications scientifiques

## Publication présentée dans le manuscrit

**Ladeuix L., Duchamp C and Levillain O.** Underestimated contribution of skeletal muscle in ornithine metabolism during mouse postnatal development. Accepté dans Amino Acids

## Publication en cours de préparation

**Ladeuix L., Duchamp C and Levillain O.** Role of ornithine aminotransferase in amino acids metabolism during mouse cold exposure. En préparation

## Communications affichées

**Benjamin Ladeuix, Monique Touret, Cécile Ritter et Olivier Levillain.** Adaptation métabolique en réponse à un stress thermique : activité ornithine aminotransférase dans les organes de souris. *20<sup>ème</sup> réunion de l'association G2L2, mars 2012, Lyon ,France.*

**Benjamin Ladeuix, Monique Touret, Cécile Ritter et Olivier Levillain.** Adaptation du métabolisme azoté hépatique des souris en réponse à un stress thermique. *4<sup>ème</sup> colloque « Génomique fonctionnelle du foie », mars 2012, Bordeaux, France*

**Benjamin Ladeuix et Olivier Levillain.** Expression de l'ornithine aminotransférase dans les tissus adipeux blanc et brun de souris mâles et femelles contrôles et exposées au froid. *17<sup>ème</sup> journée scientifique de l'EDISS, octobre 2012, Lyon, France.*



# Liste des abréviations

5-FMO: 5-fluoromethylornithine

$\alpha$ -KGDH:  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNc: Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : Adénosine diphosphate

ANOVA: Analyse de variance (Analysis of variance)

AMPc : Adénosine-5-monophosphate cyclique

Arg I: Arginase I

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ASL: Argininosuccinate lyase

ASS: Argininosuccinate synthase

ATP : Adénosine triphosphate

BAT : Tissu adipeux brun (brown adipose tissue)

    cBAT: Tissu adipeux brun de la colonne vertébrale

    iBAT: Tissu adipeux brun inter-scapulaire

    sscBAT: Tissu adipeux brun sous-scapulaire

BSA: Sérum d'albumine bovine (Bovine Serum Albumine)

CPS1: Carbamoyl phosphate synthase 1

CRE: cAMP response element

FRET: Transfert de fluorescence par résonance d'énergie (Fluorescence Resonance Energy transfert)

GLDH: Glutamate déshydrogénase

GS: Glutamine synthétase

HPRT : Hypoxanthine phosphoribosyltransférase

$K_m$ : Constante de Michaelis

MMLV: Moloney murine leukemia virus

NST : Thermogénèse sans frisson (Non shivering thermogenesis)

OAT: Ornithine aminotransférase

    cOAT: OAT cytosolique

    mOAT: OAT mitochondriale

ODC: Ornithine décarboxylase

Orn : Ornithine

OTC: Ornithine transcarbamylase

P5CDH:  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase

P5C-R: Pyrroline-5-carboxylate réductase  
PEPCK: Phosphoénolpyruvate carboxykinase  
qPCR: Réaction de polymerization en chaîne quantitative  
RIA: Radio immune assay  
SEM: Ecart standard à la moyenne (Standard Ecart to the Mean)  
T3 : 3,5,3'-tri-iodo-thyronine  
TCi : Température critique inférieure  
THR : Tyrotropin releasing hormone  
THRE: Thyroid hormone responsive element  
TSH : Thyroïd stimulating hormone  
UCP1 :Protéine découplante 1 (Uncoupling protein 1)  
 $V_{max}$ : Vitesse maximale de réaction  
WAT : Tissu adipeux blanc (White adipose tissue)  
    aWAT: Tissu adipeux blanc abdominal  
    eWAT: Tissu adipeux blanc épидидymal  
    oWAT: Tissu adipeux blanc péri-ovarien  
    pWAT: Tissu adipeux blanc paramétrial  
    rWAT: Tissu adipeux blanc péri-rénal  
    scWAT: Tissu adipeux blanc sous-cutané

# FIGURES ET TABLEAUX

## Figures

<b>Figure 1 :</b> Coopération métabolique entre les différents organes.	29
<b>Figure 2 :</b> Voies métaboliques de l'ornithine.	30
<b>Figure 3 :</b> Métabolisme des polyamines.	32
<b>Figure 4 :</b> Structure générale de l'OAT	37
<b>Figure 5 :</b> Détection par Hybridation <i>in situ</i> de l'expression des ARNm codant pour l'OAT dans les hépatocytes péri-veineux de souris mâles.	38
<b>Figure 6 :</b> Expression de l'OAT dans le rein de rats mâles.	39
<b>Figure 7 :</b> Expression de l'OAT dans l'intestin de rat.	40
<b>Figure 8 :</b> Expression relative du gène de l'OAT par RT-PCR dans les organes de souris.	41
<b>Figure 9 :</b> Localisation subcellulaire de l'OAT dans la médullaire externe de rein de ratte.	43
<b>Figure 10 :</b> Réaction catalysée par l'OAT.	44
<b>Figure 11 :</b> Expression des ARNm codant pour l'OAT et la GS hépatique en fonction de la teneur en protéines du régime alimentaire.	51
<b>Figure 12 :</b> Phénotype de souriceaux témoins ou invalidés pour le gène de l'Oat ( <i>Oat</i> <sup>-/-</sup> ).	53
<b>Figure 13 :</b> Expression relative des ARNm codant pour l'OAT dans le foie de souris au cours du développement postnatal.	57
<b>Figure 14 :</b> Expression relative et activité de l'OAT rénal au cours du développement postnatal de la souris.	59
<b>Figure 15 :</b> Développement du tissu adipeux brun (BAT) chez les rongeurs nouveau-nés.	60
<b>Figure 16 :</b> Concentration plasmatique de la testostérone.	61
<b>Figure 17 :</b> Relation entre le métabolisme, la température corporelle et la température ambiante.	63
<b>Figure 18 :</b> Réponse métabolique d'un rongeur à une exposition aiguë et chronique au froid.	64
<b>Figure 19 :</b> A : Localisation du tissu adipeux brun (BAT) chez le rongeur. B : Structure d'un adipocyte brun.	65
<b>Figure 20 :</b> Mécanisme d'activation de la thermogenèse sans frisson dans le tissu adipeux brun lors d'une exposition au froid.	66
<b>Figure 21 :</b> Découplage de l'oxydation et de la phosphorylation par la protéine découplante UCP1 lors d'une exposition au froid.	66
<b>Figure 22 :</b> Schéma anatomique du cerveau de souris.	76

<b>Figure 23</b> : Schéma anatomique de l'estomac de souris.	77
<b>Figure 24</b> : Localisation schématique des dépôts de tissu adipeux brun (BAT) et blanc (WAT) chez la souris.	77
<b>Figure 25</b> : Principe de la qPCR avec sonde Taqman®.	80
<b>Figure 26</b> : Représentation schématique du protocole de purification des mitochondries et de la fraction cytosolique.	83
<b>Figure 27</b> : Détermination des paramètres cinétiques d'une enzyme par la représentation de lineweaver-Burk.	86
<b>Figure 28</b> : Détermination des paramètres cinétiques d'une enzyme par la représentation d'Einsenthal Cornish-Bowden	87
<b>Figure 29</b> : Expression de l' <i>Oat</i> dans les organes de souris mâles et femelles.	94
<b>Figure 30</b> : Détermination du temps d'incubation pour le dosage de l'activité OAT dans les organes de souris.	96
<b>Figure 31</b> : Activité OAT dans les organes de souris mâles et femelles.	100
<b>Figure 32</b> : Activité OAT dans la fraction mitochondriale (mOAT) et la fraction cytosolique (cOAT) des principaux organes de souris mâles.	102
<b>Figure 33</b> : Activité OAT hépatique au cours du développement postnatal des souriceaux mâles et femelles.	114
<b>Figure 34</b> : Activité OAT mesurée dans le poumon des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.	115
<b>Figure 35</b> : Activité OAT mesurée dans le cœur des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.	115
<b>Figure 36</b> : Activité OAT mesurée dans le WAT des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.	116
<b>Figure 37</b> : Activité OAT mesurée dans le BAT des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.	117
<b>Figure 38</b> : Activité OAT mesurée dans le quadriceps des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.	118
<b>Figure 39</b> : Activité OAT mesurée dans le gastrocnémien des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.	119
<b>Figure 40</b> : Activité OAT mesurée dans les hémisphères, le cervelet et le tronc cérébral des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.	119
<b>Figure 41</b> : Activité OAT totale dans les organes de souris mâles et femelles adultes et âgées de 20 jours.	120
<b>Figure 42</b> : Effet du sevrage anticipé sur l'activité OAT hépatique des souris mâles et femelles au cours du développement postnatal.	122
<b>Figure 43</b> : Effet du sevrage précoce sur l'activité OAT des muscles squelettiques de souris mâles et femelles au cours du développement postnatal.	123
<b>Figure 44</b> : Concentration plasmatique en corticostérone des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.	124
<b>Figure 45</b> : Concentration plasmatique en testostérone des souriceaux mâles au cours du développement postnatal.	124
<b>Figure 46</b> : Effet de l'orchidectomie sur l'activité OAT du foie, du WAT et du muscle squelettique de souris mâles adultes.	125

<b>Figure 47</b> : Protocole expérimental.	133
<b>Figure 48</b> : Variation de la masse corporelle moyenne des souris mâles hébergées à 4°C ou 25°C au moment du sacrifice.	134
<b>Figure 49</b> : Variation quotidienne de la prise alimentaire en fonction du temps d'exposition à 4°C ou 25°C.	134
<b>Figure 50</b> : Variation de la masse relative du tissu adipeux brun (BAT) des souris mâles adultes en fonction du temps d'hébergement à 4°C ou à 25°C.	138
<b>Figure 51</b> : Variation de la masse relative moyenne du WAT des souris mâles adultes en fonction du temps d'hébergement à 4°C ou à 25°C.	138
<b>Figure 52</b> : Variations de l'expression de l' <i>Oat</i> hépatique, mesurée par qPCR Taqman®, au cours de l'exposition au froid des souris adultes mâles.	139
<b>Figure 53</b> : Variation de l'activité OAT hépatique chez les souris adultes mâles en fonction du temps d'hébergement à 4°C ou à 25°C.	139
<b>Figure 54</b> : Effet de l'acclimatation aiguë au froid sur l'activité OAT mitochondriale (mOAT) et cytosolique (cOAT) hépatique des souris mâles adultes.	140
<b>Figure 55</b> : Effet de l'acclimatation au froid sur les paramètres cinétiques de l'OAT hépatique des souris mâles adultes.	141
<b>Figure 56</b> : Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT rénal des souris mâles adultes.	142
<b>Figure 57</b> : Concentration plasmatique de l'arginine dans la veine rénale et l'aorte des souris mâles acclimatées ou non au froid.	142
<b>Figure 58</b> : Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT du BAT des souris mâles adultes.	143
<b>Figure 59</b> : Concentration des polyamines dans le BAT des souris mâles acclimatées au froid.	144
<b>Figure 60</b> : Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT du WAT des souris mâles adultes.	144
<b>Figure 61</b> : Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT du muscle gastrocnémien de souris mâles adultes.	145
<b>Figure 62</b> : Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT du muscle cardiaque chez les souris mâles adultes.	146
<b>Figure 63</b> : Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT dans le cerveau de souris mâles adultes.	146
<b>Figure 64</b> : Activation de la croissance du tissu adipeux brun par l'arginine.	159
<b>Figure 65</b> : Rôles potentiels de l'OAT dans l'activité métabolique et les régulations cellulaires.	165

## TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Localisation et quantification par hybridation <i>in situ</i> des ARNm codant pour l'OAT dans divers organes ou tissus de la souris C57Bl/6.	42
<b>Tableau 2</b> : Paramètres (temps, températures) utilisés en PCR quantitative avec sonde Taqman®.	82
<b>Tableau 3</b> : Comparaison des valeurs de $K_m$ de l'OAT obtenues par les représentations de Lineweaver-Burck et d'Eisenthal Cornish-Bowden dans quelques organes de souris mâles adultes.	87
<b>Tableau 4</b> : Inactivation de l'activité OAT par la gabaculine dans les différents organes de souris.	99
<b>Tableau 5</b> : Concentration des protéines solubles dans les organes de souris mâles et femelles.	101
<b>Tableau 6</b> : Détermination par la représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden de la constante d'affinité ( $K_m$ ) de l'OAT pour l'ornithine dans les organes de souris mâles et femelles.	104
<b>Tableau 7</b> : Détermination par la représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden de la vitesse maximale de réaction ( $V_{max}$ ) de l'OAT pour l'ornithine dans les organes de souris mâles et femelles.	105

# SOMMAIRE

<b>AVANT-PROPOS</b>	24
<b>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	27
<b>I - Métabolisme des acides aminés</b>	28
I.1 - Le cycle de l'urée	29
I.2 - La voie de synthèse des polyamines	31
I.3 - La voie de synthèse des acides aminés glucoformateurs	33
<b>II - L'Ornithine aminotransférase (OAT)</b>	34
II.1 - Structure et synthèse de l'OAT	34
II.1.1 - Le gène de l'OAT	34
II.1.2 - L'ARNm de l'OAT	34
II.1.3 - La protéine OAT	35
II.2 - Localisation tissulaire de l'OAT	37
II.2.1 - Le foie	37
II.2.2 - le rein	38
II.2.3 - L'intestin	40
II.2.4 - Les autres organes	40
II.2.5 - Localisation sub-cellulaire	42
II.3 - Réaction catalysée par l'OAT	43
II.3.1 - La réaction enzymatique	43
II.3.2 - Inhibition de l'activité OAT	45
II.3.3 - Spécificités tissulaires de la réaction enzymatique	46
II.4 - Régulation de l'expression de l'OAT	49
II.4.1 - Régulation hormonale	49
II.4.1.1 - Régulation de l'expression de l'OAT rénale	49
II.4.1.2 - Régulation de l'expression de l'OAT hépatique	50
II.4.2 - Régulation de l'expression de l'OAT par les apports protéiques de la prise alimentaire	51
II.5 - OAT et pathologies.	52
II.5.1 - L'atrophie gyrée chorio-rétinienne	53
II.5.1.1 - Description de la pathologie	53
II.5.1.2 - Les souris <i>Oat</i> <sup>-/-</sup> , un modèle d'étude	53
II.5.2 - Les cancers	54

<b>III - OAT et développement post-natal</b>	<b>56</b>
III.1- Expression de l'OAT hépatique au cours de la croissance postnatale	56
III.2 - Expression de l'OAT rénale au cours de la croissance postnatale	58
III.3 - Modifications métaboliques lors de la croissance postnatale des souris	59
III.3.1 - L'émancipation thermique	59
III.3.2- Le sevrage des animaux	60
III.3.3 - La puberté	61
<b>IV - OAT et acclimatation au froid</b>	<b>62</b>
IV.1 - Homéothermie et températures critiques	62
IV.2- Thermogenèse de régulation	63
IV.2.1 - Thermogenèse de frisson	63
IV.2.2- Thermogenèse sans frisson (NST)	65
IV.3- Conséquences de l'exposition au froid	67
IV.3.1- Augmentation de la prise alimentaire	67
IV.3.2 - Modification du métabolisme	68
IV.3.2.1 - Métabolisme glucidique	68
VI.3.2.2 - Métabolisme lipidique	70
VI.3.2.3 - Métabolisme protéique	70
IV.3.3 - Modification de l'homéostasie hormonale	71
<b>OBJECTIFS de nos travaux</b>	<b>73</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>75</b>
<b>I - Anesthésie et prélèvement des organes</b>	<b>76</b>
I.1 - Anesthésie des animaux	76
I.2 - Prélèvement des tissus et organes	76
<b>II - Analyse des transcrits codant pour l'OAT</b>	<b>78</b>
II.1 - Extraction et dosage des ARN totaux	78
II.2 - Transcription inverse des ARN messagers (ARNm)	79
II.3 - Amorces	79
II.4 - Polymérisation des ADNc	80
II.5 - PCR quantitative avec sonde Taqman©	80
II.5.1 – Principe	80
II.5.2 - PCR avec sonde Taqman©	81
<b>III - Dosage de l'activité OAT</b>	<b>82</b>
III.1 - Préparation des échantillons	82
III.2 - Purification des mitochondries et de la fraction cytosolique	82



III.3 - Dosage de l'activité OAT	84
III.3.1 – Principe	84
III.3.2 - Dosage des protéines	84
III.3.3 - Calcul de l'activité OAT	84
III.4 - Détermination des paramètres cinétiques de l'OAT	85
III.4.1 - Mesure des vitesses initiales de réaction de l'OAT	85
III.4.2 - Détermination du KM et de la VMax	86
III.4.3 - Représentation de Lineweaver-Burk	86
III.4.4 - Représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden	86
IV - Statistiques	87
 TRAVAUX EXPERIMENTAUX	 89
ETUDE 1 : Cartographie de l'expression de l'OAT dans divers organes et tissus de souris mâles et femelles, paramètres cinétiques de l'enzyme.	90
I - Introduction	90
II - Matériels et méthodes spécifiques de l'étude	90
II.1 - Animaux	90
II.2 - Anesthésie et prélèvement des organes	91
II.3 - Recherche de l'expression de l'Oat dans les organes de souris par RT-	91
II.4. Dosage de l'activité OAT	91
II.4.1 - Détermination des conditions optimales du dosage de l'activité OAT pour chaque organe et tissu	91
II.4.2 - Spécificité de la réaction catalysée par l'OAT	92
II.4.3 - Etude de l'expression différentielle de l'activité OAT	92
II.4.4 - Détermination de l'activité ornithine aminotransférase mitochondriale (mtOAT) et cytosolique (cOAT)	92
II.5 - Dosage des protéines	93
II.6 - Détermination des paramètres cinétiques de l'OAT pour l'ornithine	93
II.7. Calculs et statistiques	93
III. Résultats	94
III.1. Expression génique de l'OAT dans les organes de souris mâles et femelles	94
III.2 - Activité OAT dans les organes de souris	94
III.2.1 – Mise au point du dosage de l'activité OAT	94
III.2.2 – Interprétation des résultats	99

III.2.3 – Activité OAT dans les fractions mitochondriales et cytosolique des organes de souris mâles et femelles	102
III.3 - Détermination des paramètres cinétiques de l'OAT	103
III.3.1 - Mesure de la constante d'affinité ( $K_m$ ) de l'OAT pour l'ornithine dans les organes de souris mâles et femelles.	103
III.3.2 - Mesure de la vitesse maximale de réaction ( $V_{max}$ ) de l'OAT pour l'ornithine dans les organes de souris mâles et femelles	105
IV - Discussion	106
<b>Etude 2 : Expression de l'OAT au cours du développement postnatal de la souris mâle et femelle</b>	110
I - Introduction	110
II. Matériels et méthodes spécifiques de l'étude	111
II.1 - Animaux	111
II.2 - Anesthésie des animaux et prélèvement des organes	112
II.3 - Dosage de la concentration plasmatique de la corticostérone et de la testostérone	112
II.4 - Dosage de l'activité OAT	112
II.5 - Dosage des protéines	113
II.6 - Calculs et statistiques	113
III. Résultats	113
III.1 – Ontogénèse de l'activité OAT dans les organes et tissus de souris qui présentent un dimorphisme sexuel chez l'adulte	113
III.1.1 – Le foie	113
III.1.2 - Le poumon	119
III.1.3 - Le cœur	115
III.1.4 – Le tissu adipeux blanc (WAT)	116
III.1.5 - Le tissu adipeux brun (BAT)	116
III.1.6 - Le tissu musculaire squelettique	118
III.1.6.1 - <i>Le quadriceps</i>	118
III.1.6.1 - <i>Le muscle gastrocnémien</i>	118
III.1.7 - Le cerveau	119
III.1.8 – Contribution des différents organes au catabolisme de l'ornithine	120
III.2 - Effet du sevrage précoce des souriceaux sur l'activité OAT	121
III.2.1 – Le foie	121
III.2.2 – Le muscle squelettique	122
III.3 – Effet hormonal – Concentration plasmatique de la corticostérone et de la testostérone pendant la période postnatale	124

III.4 - Effet de la castration sur l'activité OAT	125
IV - Discussion	125
 Etude III - Expression de l'ornithine aminotransférase au cours de l'exposition au froid chez la souris mâle	131
I - Introduction	131
II. Matériels et méthodes spécifiques de l'étude	132
II.1 - Animaux et conditions d'hébergement	132
II.1.1 - Animaux et protocole expérimental	132
II.1.2 - Hébergement et alimentation	133
II.2 - Suivi de l'évolution pondérale des animaux et des aliments ingérés.	134
II.2.2 - Suivi de l'évolution pondérale des animaux	134
II.2.3 – Evolution de la prise alimentaire	134
II.3 - Anesthésie et prélèvement des organes	135
II.4 - Dosage de l'activité ornithine aminotransférase	135
II.4.1 - Mesure de l'activité OAT dans les organes	135
II.4.2 - Mesure de l'activité OAT hépatique, mitochondriale (mOAT) et cytosolique (cOAT)	135
II.5 - Dosage des protéines	135
II.6 – Mise au point des conditions de mesures des paramètres cinétiques de l'activité OAT	136
II.7 – Etude de l'expression de l'OAT hépatique par PCR quantitative	136
II.8 - Mesure de la concentration tissulaire en polyamines	136
II.9 - Calculs et statistiques	137
III. Résultats	137
III.1 - Données pondérales	137
III.1.1 – Evolution de la masse du tissu adipeux brun (BAT)	137
III.1.2 – Evolution de la masse du tissu adipeux blanc (WAT)	138
III.2 - Effets de l'acclimatation au froid sur l'OAT hépatique chez les souris mâles	138
III.2.1 - Effet de l'acclimatation au froid sur l'expression des ARNm codant pour l'Oat	138
III.2.2 - Effets de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT	139
III.2.3 - Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT mitochondriale (mOAT) et cytosolique (cOAT) hépatique	140
III.2.4 - Effet de l'acclimatation au froid sur les paramètres	141
III.3 - Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT rénale	141

<b>III.4 - Effets de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT dans les tissus</b>	<b>143</b>
<b>III.4.1 - Le tissu adipeux brun (BAT)</b>	<b>143</b>
<i>III.4.1.1 - Modifications de l'activité OAT</i>	<i>143</i>
<i>III.4.1.2 - Variation des concentrations en polyamines dans   le BAT</i>	<i>143</i>
<b>III.4.2 - Le tissu adipeux blanc (WAT)</b>	<b>144</b>
<b>III.5 - Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT des muscles</b>	<b>145</b>
<b>III.5.1 – Le muscle gastrocnémien</b>	<b>145</b>
<b>III.5.2 – Le muscle cardiaque</b>	<b>145</b>
<b>III.6 - Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT du cerveau</b>	<b>146</b>
<b>IV - Discussion</b>	<b>147</b>
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>167</b>
<b>ANNEXE</b>	<b>186</b>

## AVANT-PROPOS :

Les acides aminés interviennent dans de nombreux processus cellulaires, ils ont ainsi une grande importance biologique. Ils constituent les briques essentielles de la synthèse des protéines, ils régulent l'expression de certains gènes, ils sont des précurseurs de la synthèse d'hormones, des activateurs d'enzymes, ils jouent donc un rôle capital dans le métabolisme cellulaire.

Il n'existe pas, *stricto sensu*, de réserves d'acides aminés libres dans l'organisme et toute accumulation périphérique est potentiellement dangereuse. L'organisme doit donc être capable d'ajuster le pool d'acides aminés, par biosynthèse ou dégradation, et leur disponibilité, pour assurer en priorité le renouvellement des protéines en fonction des variations de l'apport alimentaire. Cette régulation semble spécifique pour chaque acide aminé, pour chaque organe ou tissu responsable de sa synthèse et pour chaque espèce animale avec bien souvent un dimorphisme sexuel. En général, une alimentation saine et équilibrée suffit à apporter une quantité suffisante d'acides aminés essentiels. Des périodes de déséquilibre peuvent cependant se produire, liées à une alimentation trop ou pas assez riche en glucides et lipides, à un exercice intense ou un trouble métabolique. Si l'activation du métabolisme des lipides et des glucides en réponse à des contraintes énergétiques a été bien étudiée, la contribution du métabolisme des acides aminés dans les réponses métaboliques restent très peu documentée. Quelques travaux datant d'une vingtaine d'années montrent néanmoins qu'une exposition aiguë ou chronique au froid provoque une diminution de la glutamine et une augmentation du glutamate (Lopez-Soriano & Alemany 1987) dans le tissu adipeux brun de rat. Dans le foie, les changements d'activités enzymatiques sont encore plus marqués que dans le tissu adipeux brun et la diminution de l'activité de l'adénylate déaminase associée à la forte augmentation de l'activité de la glutamate déshydrogénase sont en faveur d'une implication directe du métabolisme hépatique des acides aminés dans la réponse thermogène à une exposition au froid (Lopez-Soriano & Alemany 1988). Quant au jeûne alimentaire, il ne produit pas les mêmes effets que l'exposition au froid sur le métabolisme des acides aminés dans le tissu adipeux blanc de rat. Une forte augmentation de la glutamine synthétase adipocytaire montre la contribution de ce tissu dans l'utilisation métabolique des acides aminés glucoformateurs. Cette diversité de réponses met l'accent sur la complexité des régulations qui assurent l'homéostasie des acides aminés dans l'organisme.

Parmi les acides aminés essentiels ou semi-essentiels, l'arginine est impliqué dans une multitude de processus physiologiques et cellulaires. Outre son rôle central dans l'homéostasie azotée, il est le précurseur de nombreuses voies métaboliques qui génèrent d'autres acides aminés. Parmi ceux-ci l'ornithine est un acide aminé crucial dans la gestion du métabolisme protéique. En effet, catabolisé par l'ornithine transcarbamylyase (OTC), il intègre le cycle de l'urée dans le but de détoxifier l'organisme et éliminer les déchets azotés. Catabolisé par l'ornithine décarboxylase (ODC), il entre dans la voie de synthèse des polyamines, molécules indispensables à la prolifération et la différenciation cellulaire. Enfin, catabolisé par l'ornithine aminotransférase (OAT), il est le précurseur de nombreux acides aminés (proline, glutamate, glutamine...). Ces derniers sont dits glucoformateurs, la dégradation de leur squelette carboné libérant l'un des composés suivants :  $\alpha$ -cétooglutarate, oxaloacétate, fumarate, succinyl-CoA et pyruvate qui entrent dans le métabolisme intermédiaire pour la production de l'énergie et la gluconéogenèse hépatique et rénale.

Il nous a donc semblé opportun de cibler l'activité de l'enzyme OAT dans notre étude. Enzyme mitochondriale, au centre du carrefour métabolique entre arginine et glutamine, elle pourrait jouer un rôle important dans la régulation et la disponibilité de ces deux acides aminés, dans l'acclimatation de l'organisme aux contraintes métaboliques voire même dans son équilibre vital. L'invalidation du gène de l'OAT chez la souris est en effet létale et un défaut d'expression de l'OAT peut être impliqué dans des cas de cancers ou conduire à de graves pathologies comme l'atrophie gyrée chorioretinienne. L'expression de l'OAT a été bien étudiée dans le foie, le rein et l'intestin chez l'homme et le rat, beaucoup moins chez la souris. Ces études ont démontré l'existence d'un dimorphisme sexuel de l'expression de l'OAT dans le rein des rongeurs, ainsi que l'existence d'une régulation de l'expression de l'OAT par les hormones et la prise alimentaire. Ces mécanismes de régulation semblent être espèce, tissu et sexe spécifiques. Par exemple, la testostérone semble avoir un effet inhibiteur sur l'activité OAT rénale chez la souris alors que chez le rat, cette hormone n'a aucun effet. En revanche, une administration d'œstrogènes provoque une forte augmentation de l'activité OAT rénale aussi bien chez le rat mâle que chez la femelle (Manteuffel-Cymborowska *et al.* 1995 ; Herzfeld & Knox 1968). Cette disparité de régulation montre qu'une transposition rat/souris est impossible et souligne le besoin d'investigations chez la souris, animal de référence en génétique.

C'est dans ce contexte que nous avons construit notre étude chez la souris pour 1/ déterminer les variations de l'activité de l'OAT au cours du développement postnatal jusqu'à la puberté

pour estimer à la fois l'impact du sevrage et des hormones sexuelles ; 2/ mesurer l'activité OAT dans les organes impliqués soit dans la production de chaleur (muscles squelettiques, BAT), soit dans la gestion des réserves énergétiques et la production de substrats énergétiques (foie, rein, WAT), en réponse à une exposition aiguë et chronique au froid, chez des souris mâles adultes.

Dans une première partie introductive nous avons synthétisé les données de la littérature concernant l'OAT, sa caractérisation, la localisation de son expression, la régulation de sa fonction chez diverses espèces du règne animal. Un chapitre « Matériels et Méthodes » précis précède nos résultats qui sont organisés en trois parties. Dans une première étude nous avons recherché l'expression génique et l'activité de l'OAT dans différents organes de souris mâles et femelles. Cette véritable cartographie s'accompagne d'une caractérisation de l'enzyme. Notre deuxième étude montre l'influence du sevrage donc de l'apport alimentaire et de la puberté sur l'expression de l'OAT dans divers organes. Enfin, nous avons démontré l'implication de l'OAT dans la réponse métabolique au stress thermique froid et ceci dans les organes qui assurent l'intégrité énergétique. Les deux dernières études sont présentées sous forme d'articles soumis pour publication ou en préparation. Une discussion tente d'intégrer nos résultats dans des données plus générales du métabolisme énergétique et de la prolifération cellulaire en dégagant des perspectives de travail.



**DONNEES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**



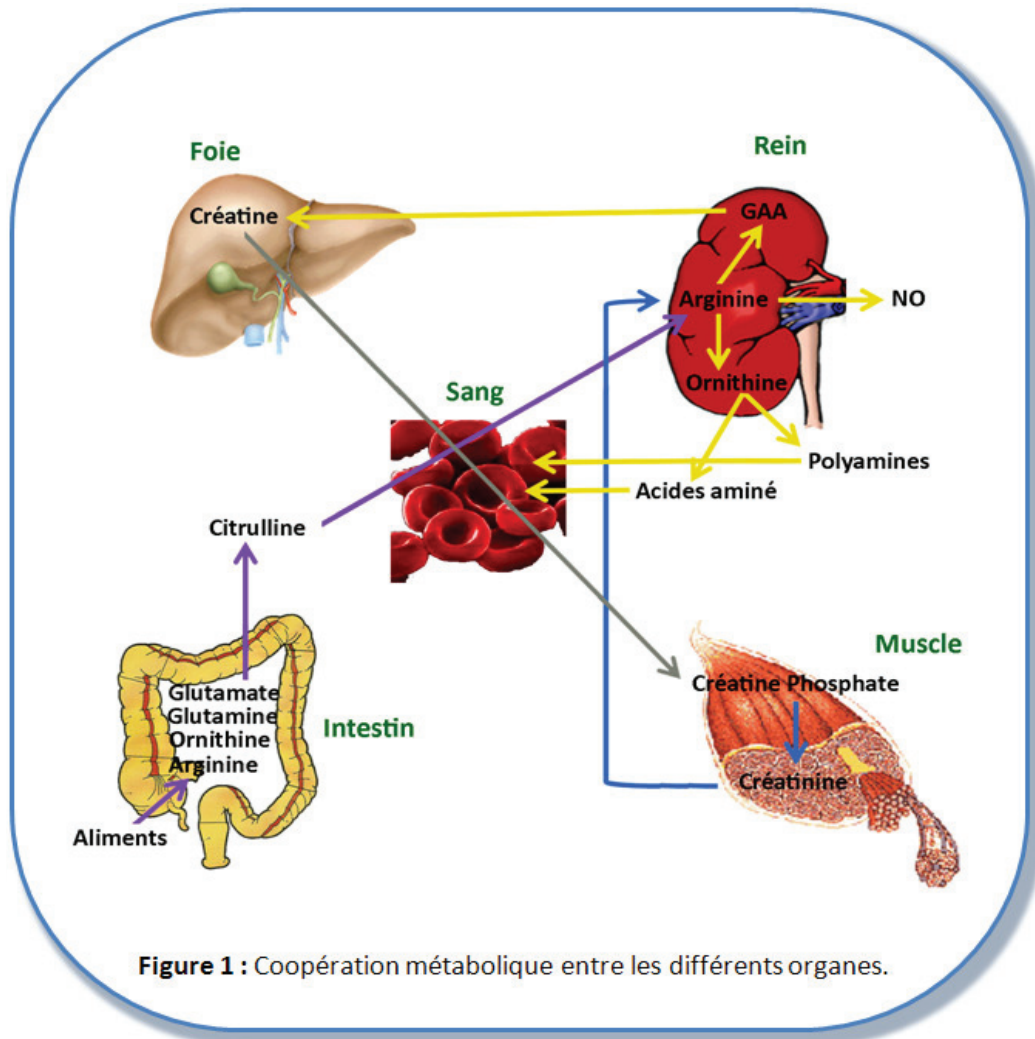
Dans cette revue bibliographique, nous avons d'abord présenté de brefs rappels sur le métabolisme des acides aminés avant de détailler les données disponibles sur l'OAT, son gène, la protéine, sa localisation cellulaire, ses particularités biochimiques et son implication dans certaines pathologies. Nous nous sommes ensuite intéressés à deux situations qui sont contraignantes pour les organismes, la croissance postnatale et l'exposition prolongée au froid ; situations susceptibles d'entraîner une perturbation du métabolisme azoté et dans lesquelles l'OAT pourrait jouer un rôle capital dans l'équilibre des flux d'acides aminés. Dans les deux cas nous avons ciblé les conséquences métaboliques.

## **I - Métabolisme des acides aminés**

Les acides aminés sont les constituants de bases des protéines et sont donc indispensables au fonctionnement cellulaire. Ce sont des acides organiques contenant au moins un radical amine et un radical carboxyle. Il existe 21 acides aminés intervenant dans la synthèse protéique. Parmi ces 21 acides aminés, 8 sont considérés comme des acides aminés essentiels et doivent être apportés par l'alimentation car notre organisme ne peut les synthétiser. Ce sont l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine. Les autres acides aminés peuvent être synthétisés *in situ* dans les différents organes, mais ils peuvent aussi être apportés par l'alimentation.

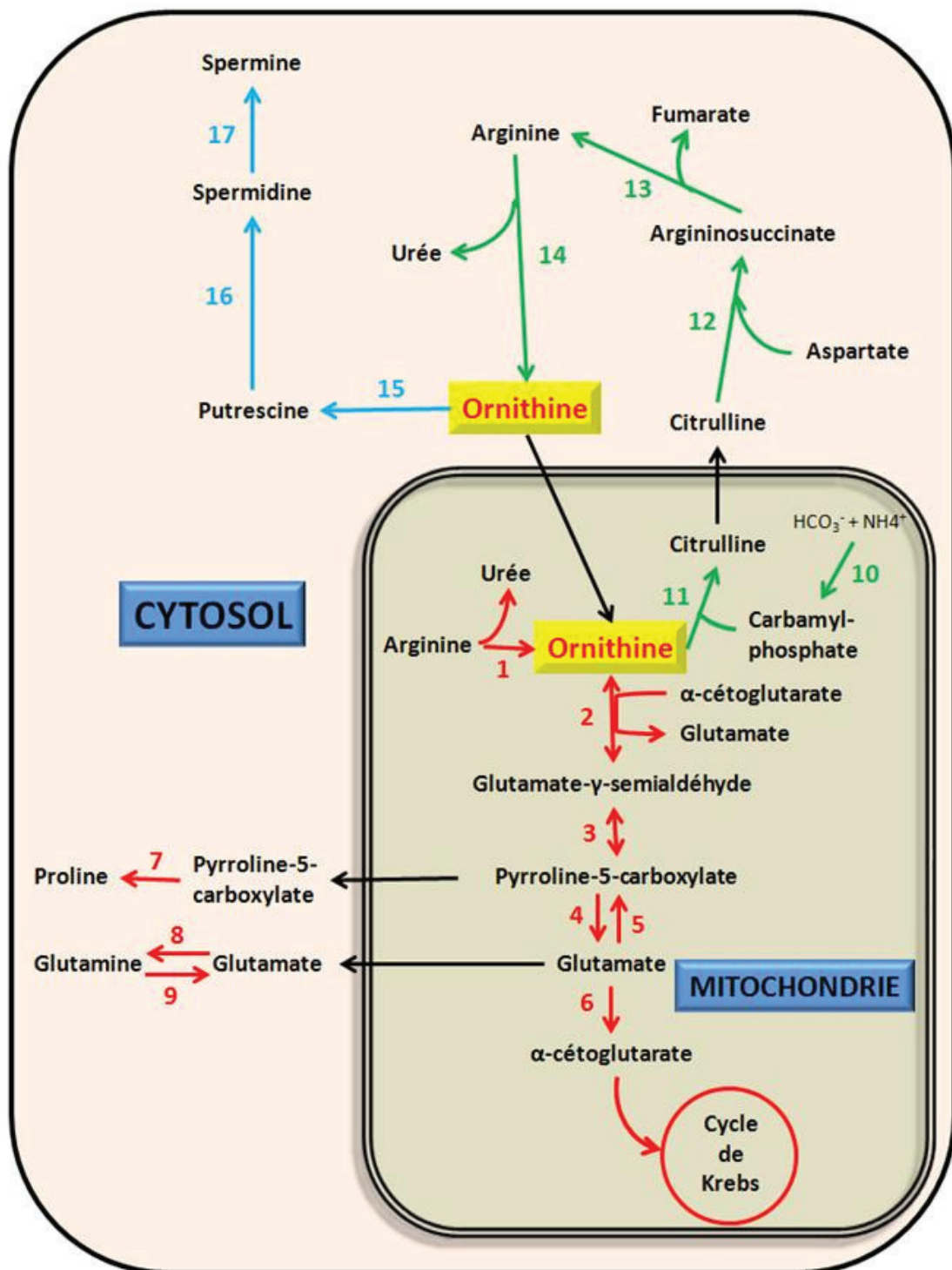
Ainsi, les acides aminés issus de la digestion du bol alimentaire sont absorbés dans l'intestin et acheminés jusqu'au foie *via* la veine porte. Les acides aminés peuvent être catabolisés dans le foie ou bien ils peuvent être libérés dans la circulation générale pour être mis à la disposition des autres organes. Le maintien de l'homéostasie azotée implique donc un système de communication inter-organes finement régulé pour adapter la production / le catabolisme des acides aminés dans chaque organe et en fonction de la situation métabolique (Fig. 1). Par exemple, il a été démontré que la synthèse d'arginine est au centre d'une communication inter-organes qui implique la conversion de la glutamine en glutamate, ornithine et citrulline avec la participation de l'intestin, du foie, de la rate et du rein notamment (Poll *et al.* 2007). Les différents métabolites qui permettent ces flux d'acides aminés peuvent aussi être impliqués dans différentes voies métaboliques, créant une compétition pour l'utilisation des substrats par les différentes enzymes. C'est le cas de l'ornithine qui, issue du catabolisme de l'arginine est impliquée dans 3 grandes voies métaboliques que nous avons détaillées dans la figure 2 : la

voie du cycle de l'urée, la voie de la synthèse des polyamines et la voie de la synthèse des acides aminés, lesquelles confèrent à cet acide aminé un rôle physiologique fondamentale dans l'organisme.



## I.1 - Le cycle de l'urée

Le cycle de l'urée ou cycle de l'ornithine a été décrit pour la première fois par Krebs et Henseleit (1932). Ce cycle se déroule dans le foie et plus exactement dans les hépatocytes péri-portaux pour produire de l'urée à partir de l'ammoniaque, l'urée étant le principal produit d'élimination du métabolisme azoté. Les réactions biochimiques ont lieu dans les deux compartiments cellulaires : *le cytosol et la mitochondrie*.



**Figure 2 : Voie métaboliques de l'ornithine.** **Rouge** : voie de synthèse des acides aminés glucoformateurs ; **Vert** : le cycle de l'urée ou cycle de l'ornithine ; **Bleu** : voie de synthèse des polyamines. 1 : Arginase II ; 2 : Ornithine aminotransférase ; 3 : cyclisation spontanée ; 4 : Pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase ; 5 : Pyrroline-5-carboxylate synthétase ; 6 : Glutamate déshydrogénase ; 7 : Pyrroline-5-carboxylate réductase ; 8 : Glutamine synthétase ; 9 : Glutaminase ; 10 : Carbamyl-phosphate synthétase I ; 11 : Ornithine carbamyl transférase ; 12 : Argininosuccinate synthétase ; 13 : Argininosuccinase ; 14 : Arginase I ; 15 : Ornithine décarboxylase ; 16 : Spermidine synthétase ; 17 : Spermine synthétase.

*Dans la mitochondrie* : 1) une molécule de bicarbonate et une molécule d'ammoniaque sont converties en carbamyl-phosphate par la carbamyl-phosphate synthase 1 (CPS1, EC 6.3.4.16) ; 2) la deuxième étape enzymatique est catalysée par l'ornithine transcarbamylase (OTC, EC 2.1.3.3) et aboutit à la formation de citrulline à partir de l'ornithine et du carbamoyl-phosphate.

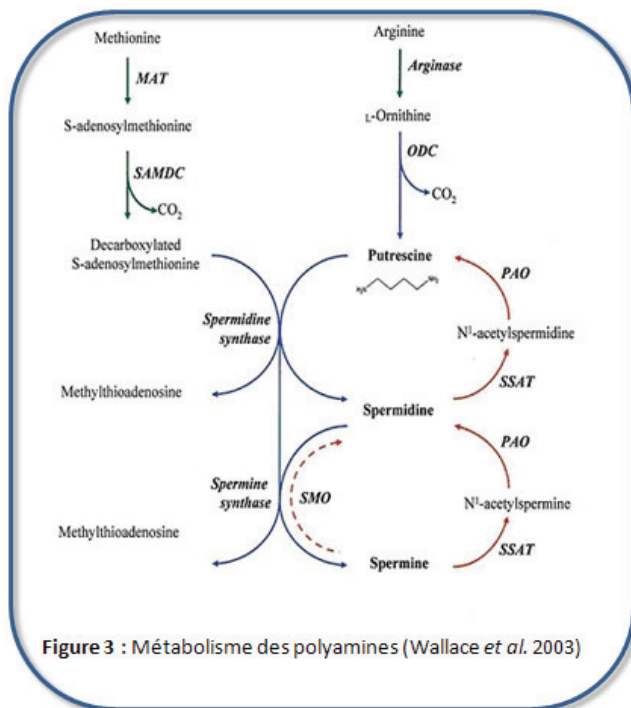
*Dans le cytosol*, 3) la citrulline se condense avec l'aspartate en un produit intermédiaire, l'argininosuccinate sous l'action de l'argininosuccinate synthase (ASS, EC 6.3.4.5) ; 4) le clivage de l'argininosuccinate en arginine avec libération de fumarate est catalysé par l'argininosuccinate lyase (ASL, EC 4.3.2.1) ; 5) la dernière étape du cycle est contrôlée par une hydrolase, l'arginase I (Arg I, EC 3.5.3.1), pour former de l'urée et de l'ornithine (Levillain 2011). L'ornithine ainsi formé est prêt à être réutilisé à l'étape 2) et l'urée qui est toxique pour l'organisme, diffuse dans le sang pour être éliminée dans les urines (Shambaugh 1977). Ces étapes sont catalysées par deux enzymes mitochondriales (CPS1 et OCT) (Clarke 1976) et trois enzymes cytosoliques (ASS, ASL et Arg I) (Morris 2006). En plus de ces 5 enzymes, une sixième enzyme n'intervenant pas directement dans le cycle de l'urée est nécessaire : la glutaminase. En effet, elle catabolise la dégradation de la glutamine en glutamate et en ammoniaque qui entre alors dans le cycle de l'urée *via* CPS1. Pour assurer un bon fonctionnement de l'uréogénèse, les transporteurs mitochondriaux de l'ornithine (ORNT1) et de la citrulline sont indispensables. Les enzymes nécessaires au déroulement de l'uréogénèse sont exprimées dans le foie, l'intestin et le rein, mais seul le foie présente un niveau d'expression suffisant de ces 5 enzymes pour assurer l'uréogénèse (Jones *et al.* 1961).

## **I.2 - La voie de synthèse des polyamines**

La seconde voie métabolique dans laquelle l'ornithine est impliqué est la voie de synthèse des polyamines (Figures 2 et 3). Chaque cellule de l'organisme peut fabriquer les polyamines (putrescine, spermidine et spermine) à partir de l'ornithine. Les premières publications scientifiques sur les polyamines datent des années 1950. Depuis, de nombreuses équipes travaillent sur ces molécules afin d'élucider leurs rôles et leur importance dans l'organisme. Il s'avère que les concentrations cellulaires en polyamines sont finement régulées par un ensemble complexe d'enzymes de synthèse ou de dégradation ainsi que par des transporteurs spécifiques. Cette complexité laisse penser que les polyamines ont un rôle essentiel dans la vie et la survie des cellules. Aujourd'hui, nous savons que les polyamines, du fait de leurs charges

positives, ont une affinité pour les structures négativement chargées de l'organisme (notamment les acides nucléiques), ce qui explique en partie leurs différentes fonctions :

- ✓ Elles interviennent sur la stabilisation, la condensation et la conformation de l'ADN ;
- ✓ Elles jouent également un rôle dans la transcription de l'ARN ;
- ✓ Elles sont indispensables à la croissance et à la prolifération cellulaire en intervenant directement sur le cycle cellulaire ;
- ✓ Elles régulent la réponse immunitaire ;
- ✓ Elles modulent le fonctionnement de récepteurs du système nerveux central comme les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Soulet & Rivest 2003 ; Thomas & Thomas 2001)



La voie de synthèse des polyamines fait intervenir quatre réactions enzymatiques interdépendantes (Figure 3). La putrescine est formée à partir de la décarboxylation de l'ornithine par l'ornithine décarboxylase (ODC). La putrescine est combinée, *via* la spermidine synthétase, à une molécule de S-adéno-sylméthionine décarboxylée formée par la S-adéno-sylméthionine décarboxylase. Puis la spermidine est métabolisée en spermine *via* la spermine synthétase également en présence d'une

molécule de S-adénosylméthionine décarboxylée. Pour gérer ses concentrations en polyamines, la cellule dispose non seulement d'enzymes de synthèse mais aussi d'enzymes de conversion inverse :

- ✓ La spermine peut être transformée en spermidine par la polyamine oxydase (PAO) ;
- ✓ La spermidine peut à son tour être convertie en putrescine par cette même polyamine oxydase.

Cette voie de conversion inverse est précédée d'une étape d'acétylation catalysée par l'acétyl-Coenzyme A.

### I.3 - La voie de synthèse des acides aminés glucoformateurs

La troisième voie métabolique impliquant l'ornithine est contrôlée dans la mitochondrie par l'ornithine amino-transférase (OAT, EC 2.6.1.13) (Figure 2). L'ornithine est transaminé en présence d' $\alpha$ -cétoglutarate et génère une molécule de glutamate et une molécule d'acide glutamique- $\gamma$ -semialdéhyde. Cet acide est orienté vers la synthèse de glutamate ou de proline. En effet, après la cyclisation spontanée et réversible de l'acide glutamique- $\gamma$ -semialdéhyde en  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate, cette molécule est convertie en L-glutamate par la  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase (P5CDH, EC : 1.5.1.12), ce qui aboutit à la formation de 2 molécules de L-glutamate à partir d'une molécule d'ornithine. Dans le cytosol, le  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate peut aussi être catabolisé en proline par la pyrroline-5-carboxylate réductase (P5C-R, EC 1.5.1.2). Dans la mitochondrie, le L-glutamate peut être catabolisé par la glutamate déshydrogénase (GLDH, EC 1.4.1.3) en  $\alpha$ -cétoglutarate qui peut intégrer le cycle de Krebs. Là, l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase ( $\alpha$ -KGDH, EC 1.2.4.2) décarboxyle l' $\alpha$ -cétoglutarate et produit du succinyl-CoA. Les équivalents réducteurs et le GTP obtenus dans le cycle de Krebs seront convertis en énergie sous forme d'ATP. Cette voie montre que l'ornithine est potentiellement une source d'énergie pour la cellule. Enfin, dans le cytosol, la glutamine synthétase (GS, EC 6.3.1.2) catabolise le glutamate en glutamine.

Ainsi, l'ornithine, catabolisé par l'OAT, est le précurseur de la proline, du glutamate, de la glutamine et de l' $\alpha$ -cétoglutarate. Les 3 premiers acides aminés sont dits glucoformateurs : ils permettent la synthèse de glucose *via* la néoglucogenèse. Il faut ajouter que le métabolisme de l' $\alpha$ -cétoglutarate conduit à l'oxaloacétate qui est un substrat clé de la néoglucogenèse hépatique et rénale.

*In fine, la voie de dégradation métabolique de l'OAT pourrait être une source de substrats énergétiques nécessaires au maintien de l'homéostasie, pour faire face à des contraintes physiologiques se produisant spontanément (développement postnatal) ou étant imposées à l'organisme (exposition au froid), C'est pour cette raison que nous avons ciblé cette voie en particulier. Elle fera donc l'objet d'une étude bibliographique détaillée.*



## **II - L'Ornithine aminotransférase (OAT)**

C'est une enzyme présente chez tous les organismes vivant : le règne animal (Scher & Vogel 1957), le règne végétal (Lu & Mazelis 1975 ; Roosens *et al.* 1998 ; Nada *et al.* 2010), les mycètes ou plus simplement les champignons (Scher & Vogel 1957) et même chez les procaryotes (Yasuda *et al.* 1981). L'ornithine aminotransférase (OAT, L-ornithine 2 -oxo acid aminotransferase, E.C. 2.6.1.13) est une enzyme mitochondriale qui catalyse la conversion réversible de l'ornithine en glutamate semi-aldéhyde et de l' $\alpha$ -cetoglutarate en glutamate. Elle assure donc le catabolisme et l'anabolisme de l'ornithine, acide aminé dont la fonction varie selon qu'il est impliqué dans le cycle de l'urée, dans la synthèse des polyamines ou dans la voie de synthèse des acides aminés glucoformateurs.

### **II.1 - Structure et synthèse de l'OAT**

#### **II.1.1 - Le gène de l'OAT**

C'est en 1988, que plusieurs groupes localisent le gène de l'OAT sur le chromosome 10 humain (Mitchell *et al.* 1988 ; O'Donnell *et al.* 1988). Ce gène a une taille de 21 kb et contient 11 exons dont la taille varie de 52 pb (exon 1) à 793 pb (exon 11). Cette même année, le gène de l'OAT murin a été localisé sur le chromosome 7 (Ramesh *et al.* 1988), localisation qui sera confirmée un peu plus tard (Ramesh *et al.* 1992). L'analyse comparée d'une portion de la région promotrice du gène de l'OAT chez l'humain, la souris et le rat montre une très grande homologie structurale (Shull *et al.* 1995a). Cependant, contrairement à ce qui a été démontré chez l'homme (Mitchell *et al.* 1988), cette portion du gène de l'OAT contient chez le rat une séquence semblable à la séquence nucléotidique du THRE (Thyroid Hormone Responsive Element) et chez la souris deux séquences nucléotidiques similaires au CRE (cAMP Response Element) et au THRE. Ces séquences pourraient permettre une régulation de l'expression de l'OAT par les hormones chez la souris et le rat.

#### **II.1.2 - L'ARNm de l'OAT**

Mueckler et Pitot (1985) ont été les premiers à publier la séquence de l'ARNm de l'OAT hépatique chez le rat. Cet ARNm contient un cadre de lecture ouvert de 1317 bases codant un polypeptide d'environ 48 kDa. Cette étude a été suivie quelques années plus tard par l'analyse

et la publication de la séquence de l'ARNm codant pour l'OAT humain (Mitchell *et al.* 1988). Cet ARNm d'origine hépatique comporte une séquence non codante de 65 bases nucléotidiques en 5', un cadre de lecture ouvert de 1317 bases nucléotidiques et une séquence 3' non transcrite de 635 bases nucléotidiques contenant un unique signal de polyadénylation. Sa comparaison avec la séquence de l'ARNm isolé du foie de rat montre un pourcentage de similitude de 84,3%. De plus, l'analyse de la séquence de l'ARNm codant pour l'OAT du rein humain (Kobayashi *et al.* 1989) montre que les séquences non transcrites en régions 5' et 3' sont identiques dans le rein et le foie humains.

Chez le rat, un seul et même ARN a été détecté dans le foie et le rein (Ozaki *et al.* 1999).

### **II.1.3 - La protéine OAT**

La première purification de l'OAT a été réalisée à partir de foie de rat (Peraino *et al.* 1969). D'un point de vue biochimique, l'OAT est principalement composée de glutamate (9,2%), de leucine (8,7%) et d'alanine (8,4%). La composition en acides aminés de l'OAT du rein et du foie de rat est très similaire (Oyama *et al.* 1990). La séquence peptidique de l'OAT issue du foie ou du rein aussi bien chez le rat que l'homme a été publiée par de nombreux auteurs (Mueckler & Pitot 1985 ; Mitchell *et al.* 1988 ; Kobayashi *et al.* 1989).

L'OAT est codée par le génome nucléaire, la protéine est synthétisée dans le cytosol sous la forme d'un précurseur de 439 acides aminés et d'un poids moléculaire de 49 kDa (Mueckler & Pitot 1985) qui sera internalisé dans la matrice mitochondriale. Cette pré-protéine contient en effet, un peptide d'adressage à la mitochondrie qui sera clivé lors de l'entrée de l'OAT dans la mitochondrie. L'emplacement précis du site de clivage du peptide d'adressage à la mitochondrie est sujet à controverse. Certains auteurs (Mueckler & Pitot 1985 ; Simmaco *et al.* 1986) ont montré que le peptide d'adressage est clivé après le glutamate-34 ou l'alanine-25 chez le rat, tandis que d'autres (Inana *et al.* 1986), travaillant sur des cellules de foie, de la rétine et de rétinoblastome humain, décrivent le clivage du peptide après la lysine-32. Une autre étude montre que le clivage s'effectue après la glycine-35 dans le rein humain et le foie de rat (Kobayashi *et al.* 1989) entretenant les divergences probablement dues à des variations inter-organes et inter-espèces. Une hypothèse de clivage en plusieurs étapes a cependant été émise (Oyama *et al.* 1990) comme ce qui a été décrit pour d'autres enzymes. Par exemple, le clivage du peptide d'adressage à la mitochondrie de l'OTC (Sztul *et al.* 1987) ainsi que celui de la

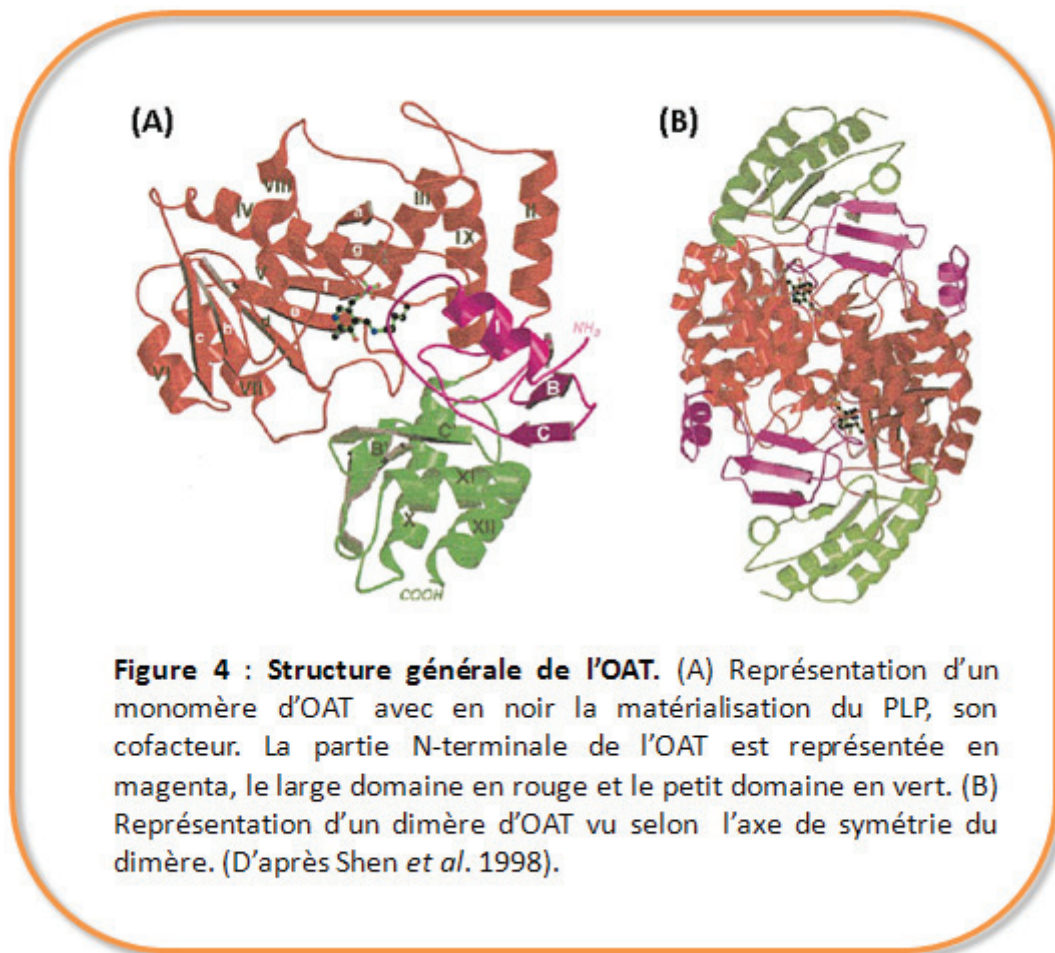


malate déshydrogénase (Sztul *et al.* 1988) se font en deux étapes. Un tel mécanisme de clivage multiple du peptide d'adressage à la mitochondrie pourrait se produire pour l'OAT, ce qui expliquerait les différences de tailles de la protéine mature rencontrées dans la littérature : 43 kDa à 45 kDa dans le foie de rat (Mueckler *et al.* 1982 ; Mueckler & Pitot 1985), 48 kDa dans le rein de souris (Levillain *et al.* 2007).

Ces différences sur la taille de la protéine et le lieu de clivage du peptide d'adressage à la mitochondrie ne sont pas les seuls points de désaccord de la communauté scientifique à propos de l'OAT. En effet, pour certains scientifiques, l'OAT synthétisée est spécifique de l'organe et de l'espèce et il existerait autant d'iso-enzymes de l'OAT que d'organes qui la synthétisent. Lim et collaborateurs (1998) ont mis en évidence une différence de 6 acides aminés en position N-terminale entre l'OAT issue de l'intestin et l'OAT synthétisée dans le foie de souris. Chez le rat, l'analyse de l'activité enzymatique en fonction de la température d'incubation révèle de grandes différences entre l'OAT hépatique et rénale (Volpe *et al.* 1974). L'OAT rénale est inactivée plus rapidement par la température que l'OAT hépatique et a une affinité plus forte pour ses substrats. Ces résultats sont en faveur de l'existence d'iso-enzymes. Au contraire, certains chercheurs réfutent complètement l'existence d'iso-enzymes de l'OAT. Sanada et collaborateurs (1970) ont comparé l'OAT issue du foie, du rein et de l'intestin grêle de rat. Ils ont montré que leur comportement lors de la centrifugation et leur comportement électrophorétique, leur spectre d'absorption, leur pH optimal ou bien leur affinité pour l'ornithine ainsi que pour l' $\alpha$ -cétoglutarate sont identiques. Oyama et collaborateurs (1990) ont analysé et publié les séquences des acides aminés qui composent l'OAT rénale et hépatique de rat, et les ont comparées avec les séquences rénales et hépatiques de l'humain. Les comparaisons de ces séquences d'acides aminés montrent une très forte similitude (91 à 95% d'homologie) entre les 4 OAT étudiées. A l'heure actuelle, le débat sur l'existence ou non d'iso-enzymes de l'OAT spécifiques de l'organe reste encore ouvert.

Des études de cristallographies ont été réalisées sur la structure de l'OAT dans le foie de rat (Peraino *et al.* 1969) ainsi que dans le foie humain (Ohura *et al.* 1982) (Fig. 4). Elles ont mis en évidence que la forme active de l'OAT est un dimère composé de deux monomères d'OAT. Chaque monomère est constitué de 12 hélices  $\alpha$  et de 14 feuillets  $\beta$ . Les monomères sont liés entre eux par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes. Trois dimères s'associent pour former une structure composée de 6 OAT (Marković-Housley *et al.* 1987 ; Shen *et al.* 1998). Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris, l'unité catalytique active de

l'OAT est un dimère, et les dimères se regroupent en polymères de taille plus importante pour de fortes concentrations en OAT (Lim *et al.* 1998).



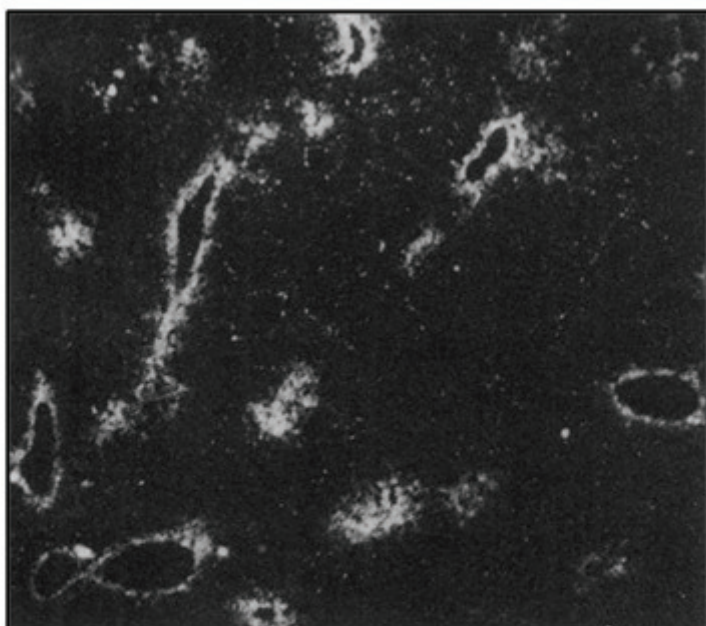
## II.2 - Localisation tissulaire de l'OAT

L'expression de l'OAT a été détectée et son activité mesurée par différentes méthodes, chez de nombreuses espèces et dans de nombreux organes. La grande majorité des travaux ont cependant été réalisés chez l'Homme et le rat.

### II.2.1 - Le foie

Les premières mesures d'activité OAT dans le foie ont été réalisées chez des rats mâles (Peraino & Pitot 1963 ; Peraino & Pitot 1964). Brennan et ses collaborateurs (1970) ont été les premiers à étudier par immunofluorescence la localisation de l'expression de l'OAT dans le foie de rats mâles de souche SD/An1. Leurs résultats ont révélé un marquage cytoplasmique des hépatocytes. Ils ont observé que l'expression de l'OAT était hétérogène au sein des différentes populations d'hépatocytes. Par hybridation *in situ*, ce marquage hétérogène a été retrouvé,

préférentiellement accumulé dans les mitochondries des hépatocytes péri-centraux aussi nommés hépatocytes péri-veineux (Fig. 5) (Kuo *et al.* 1991).



**Figure 5** : Détection par Hybridation *in situ* de l'expression des ARNm codant pour l'OAT dans les hépatocytes péri-veineux de souris mâles. (D'après Kuo *et al.* 1991).

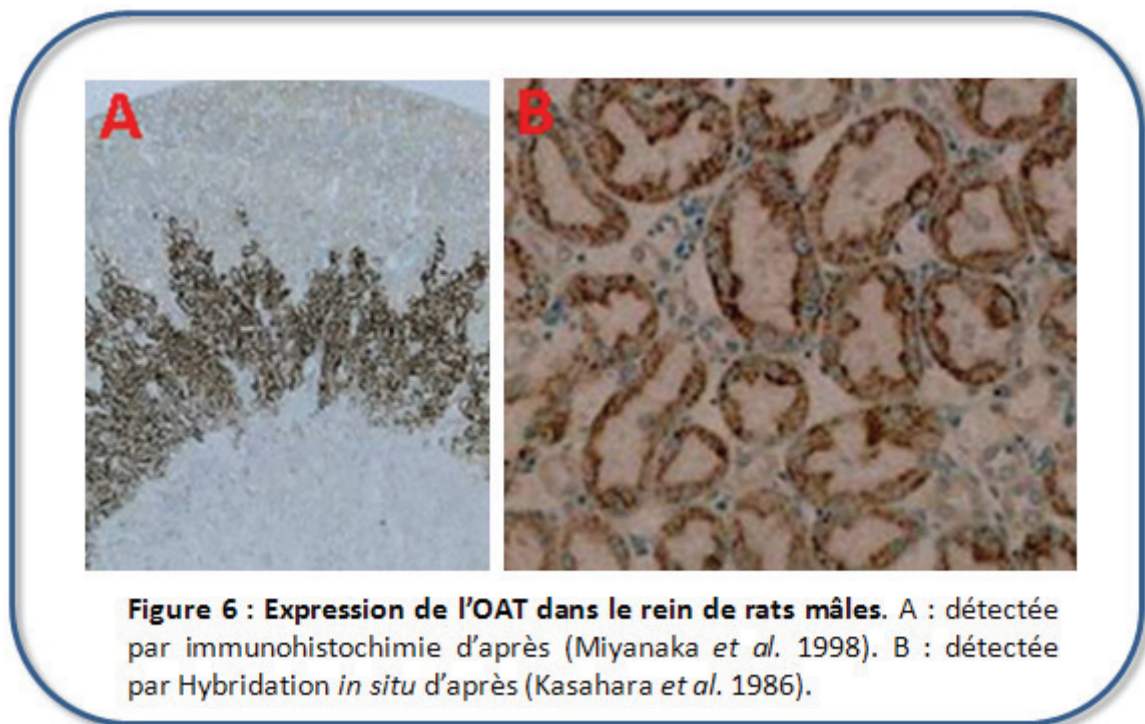
A la suite de ces résultats, l'expression et l'activité de l'OAT hépatique ont été étudiées et quantifiées chez de nombreuses espèces : chez l'homme (Greengard & Herzfeld 1977), le rat (Peraino & Pitot 1963 ; Peraino & Pitot 1964), la souris (Kuo *et al.* 1991 ; Ventura *et al.* 2009 ; Ventura *et al.* 2010), le poulet (Baich & Ratzlaff 1980), le bœuf (Hayasaka *et al.* 1980), le chat (Valle *et al.* 1981) et le lapin

(Shiono *et al.* 1982). A notre connaissance, seule l'étude de Ventura et collaborateurs (2009) a comparé l'activité OAT hépatique de souris mâles et femelles et a mis en évidence un dimorphisme sexuel de l'activité OAT hépatique. En effet, dans cette étude, l'activité OAT hépatique des souris femelles est 1,2 fois supérieure à celle des souris mâles.

## II.2.2 - le rein

Herzfeld et Knox (1968) ont été les premiers à détecter et quantifier une activité OAT dans le rein de rat mâles. Il faut attendre 1986 pour que sa localisation cellulaire soit précisée chez le rat Wistar mâle (Kasahara *et al.* 1986) et confirmée par hybridation *in situ* dans les cellules épithéliales des tubules proximaux. Miyanaka et collaborateurs (1998), quant à eux, ont localisé par immunohistochimie l'expression de l'OAT dans la zone externe de la médullaire externe du rein de rats Wistar mâles (Fig. 6). Des expériences de western blot et d'immunofluorescence ont permis de mettre en évidence une expression hétérogène de l'OAT le long de l'axe cortico-

papillaire du rein de rats mâles et femelles Sprague-Dawley (Levillain *et al.* 2004). En effet, l'expression de l'OAT augmente du cortex superficiel à la zone externe de la médullaire externe.



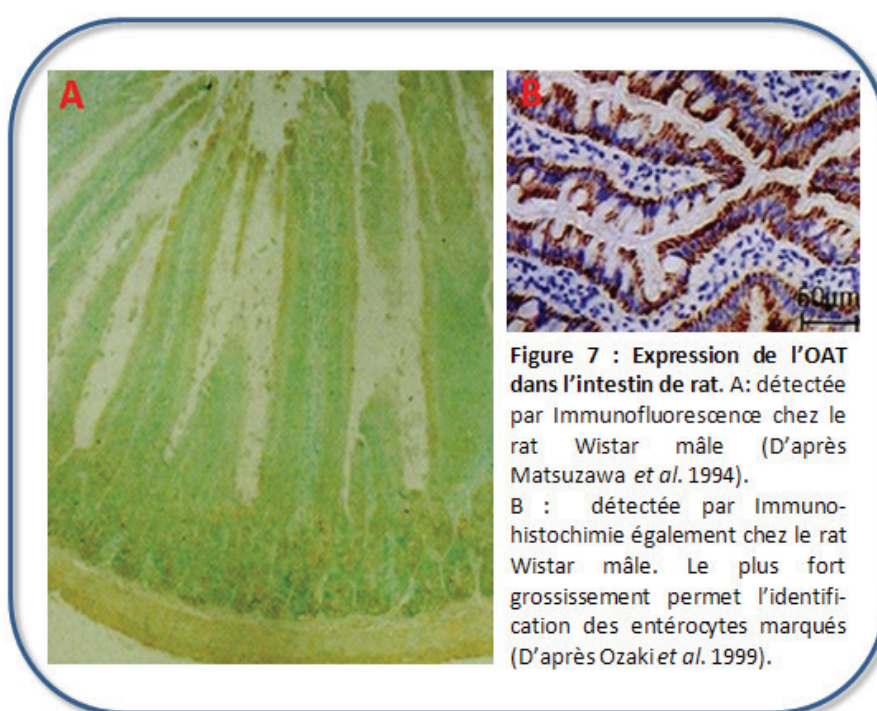
De nombreuses études ont mis en évidence un dimorphisme sexuel de l'expression de l'OAT rénale chez le rat et la souris. Ainsi, l'abondance de la protéine OAT et l'activité enzymatique mesurées chez les femelles sont supérieures à celles des mâles (Herzfeld & Knox 1968 ; Herzfeld & Greengard 1969 ; Levillain *et al.* 2004 ; Levillain *et al.* 2005b ; Levillain *et al.* 2007). Ce dimorphisme sexuel est associé à une différence dans la distribution de l'enzyme le long de l'axe cortico-papillaire et dans le néphron. En effet, chez la souris mâle, l'OAT est plus particulièrement exprimée dans la médulla, principalement dans la branche ascendante de l'anse de Henlé, alors que chez les souris femelles, l'expression de l'OAT est plus forte au niveau cortical, indiquant une expression importante au niveau du tube proximal (Levillain *et al.* 2007). Ces différences de distribution de l'OAT entraîneraient une modification de l'orientation du métabolisme de l'ornithine en fonction du profil enzymatique du segment du néphron. Ainsi chez les mâles, la forte activité de l'ODC dans le tube proximal supplanterait l'activité OAT dans la médulla et entraînerait une utilisation préférentielle de l'ornithine pour la synthèse des polyamines (Kuo & Darnell 1989 ; Lie-Venema *et al.* 1997). L'OAT rénale a été également étudiée chez d'autres espèces, le porc, le chien, le chat ou le macaque, sa distribution et son



activité semblent spécifiques de l'espèce (Ragland & Pitot 1971 ; Valle *et al.* 1981 ; Lünsdorf *et al.* 2005 ; Levillain *et al.* 2008).

### II.2.3 - L'intestin

Les premières mesures d'activité OAT intestinale ont été réalisées chez le rat (Herzfeld & Knox 1968 ; Sanada *et al.* 1970). L'immunohistochimie utilisant un anticorps spécifique, réalisée sur de l'intestin grêle de rats mâles Wistar a permis de localiser l'expression de l'OAT dans les entérocytes des cryptes et de l'épithélium intestinal (Kasahara *et al.* 1986 ; Matsuzawa *et al.* 1994) (Fig. 7). Cette OAT intestinale est régulée par l'apport en protéines du régime alimentaire. En effet, un régime enrichi en protéines induit une diminution de l'activité OAT



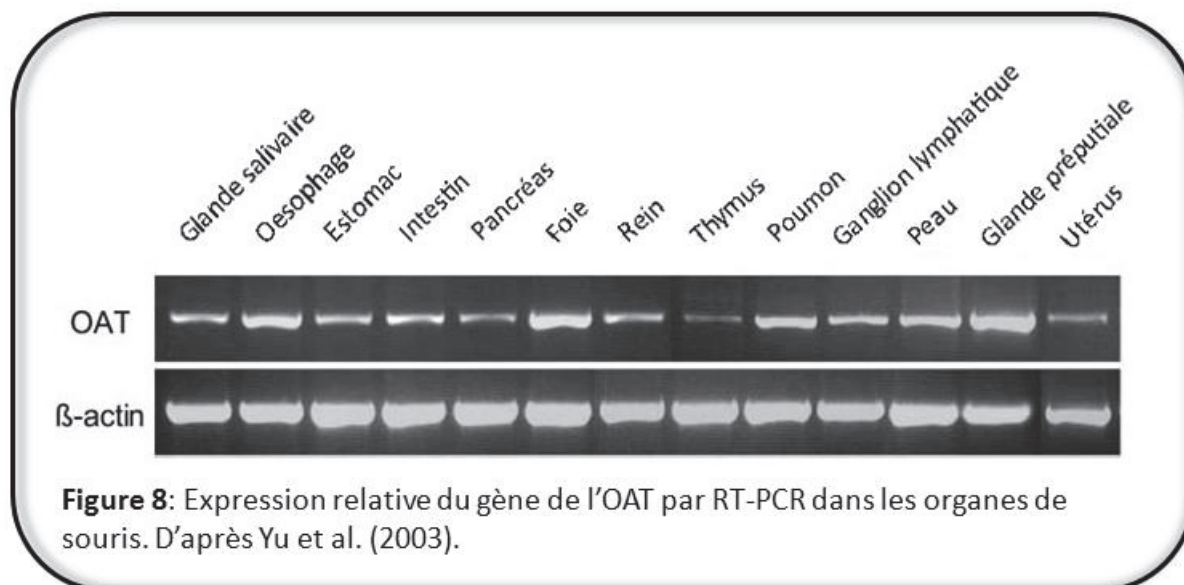
intestinale (Matsuzawa *et al.* 1994). L'expression de l'OAT dans l'intestin de souris a été localisée plus tardivement, par hybridation *in situ*, dans les entérocytes tout le long des villosités intestinales (Fig. 7) (Riby *et al.* 1990 ; Lim *et al.* 1998 ; Yu *et al.* 2003).

### II.2.4. - Les autres organes

Si l'OAT est une enzyme exprimée de façon majoritaire dans le foie, le rein et l'intestin, elle n'en reste pas moins une enzyme ubiquitaire retrouvée dans de nombreux organes par des techniques de mesure d'activité enzymatique, de Western blot, d'hybridation *in situ* ou de microscopie photonique.

Ainsi, les ARNm et la protéine de l'OAT ont été détectés dans le poumon, le cerveau, le cœur, la rate, la glande mammaire, la glande sous-maxillaire de rat (Herzfeld & Knox 1968 ; Herzfeld & Raper 1976a ; Mezl & Knox 1977 ; Wong *et al.* 1981 ; Ravi Kumar *et al.* 2009) ; dans le poumon

humain (Greengard & Herzfeld 1977) ; dans la rétine et l'épithélium pigmentaire de l'œil de poulet (Baich & Ratzlaff 1980), dans l'œil de bœuf (Hayasaka *et al.* 1980), les muscles squelettiques du chat (Valle *et al.* 1981) ; le cerveau de macaque (Ragland & Pitot 1971) et dans l'œil de lapin (Shiono *et al.* 1982).



Chez la souris C57Bl/6J, Yu et collaborateurs (2003) ont mis en évidence l'expression de l'OAT par RT-PCR et hybridation *in situ* dans 13 organes de souris dont la glande salivaire, l'estomac, le pancréas, le thymus, le poumon, la peau ou encore l'utérus (Fig. 8).

L'hybridation *in situ* a permis de localiser les ARNm codant pour l'OAT seulement dans certaines populations cellulaires des tissus ou organes de souris (Tableau 1)

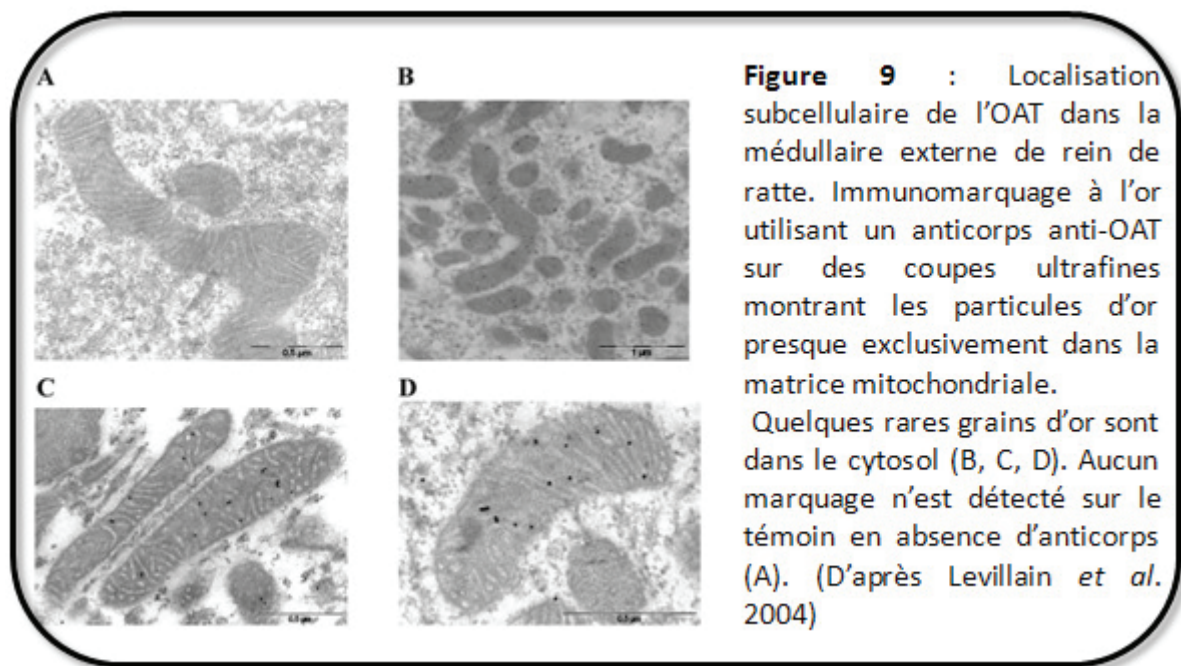
Organes	Tissus ou types cellulaires	OAT
Glande salivaire	Epithélium sécrétoire des glandes muqueuses	++
Œsophage	Epithélium squameux	-
Estomac	Glande gastriques	++
Petit intestin	Villosités et entérocytes des cryptes	+++
Foie	Hépatocytes péricentraux	+++
Pancréas	Glandes exocrines	++
Rein	Tubules proximaux externes	+++
Peau	Bulbe pileux	++
Cavité pleurale	Macrophages	-
Nœud lymphatique	Lymphocytes	-
Thymus	Lymphocytes	+
Ganglion sympathique	Neurones	+
Glande préputiale	Epithélium sécrétoire	+++
Utérus	Endomètre	-
Rate	Cortex	+
Moelle osseuse	Cellules sanguines	+

**Tableau 1 : Localisation et quantification par hybridation *in situ* des ARNm codant pour l'OAT dans divers organes ou tissus de la souris C57Bl/6.** L'abondance relative des ARNm codant pour l'OAT est estimée ainsi : (+) faible, (++) moyenne, (+++) forte, (-) absente. (D'après Yu *et al.* 2003).

## II.2.5. – Localisation sub-cellulaire

Une fois son peptide d'adressage mitochondriale clivé, nous avons vu que l'OAT est localisée dans la matrice mitochondriale (Ip *et al.* 1974 ; Kobayashi *et al.* 1995). Un immunomarquage à l'or en microscopie électronique à transmission a permis de confirmer cette localisation (Fig. 9) (Levillain *et al.* 2004).

Cette même étude montre que l'OAT a une distribution inégale le long du néphron et suggère que le devenir du L-ornithine dépendrait du contexte et des besoins cellulaires.



*Si la localisation ubiquitaire de l'OAT est largement décrite, elle fait émerger la question du/des rôle(s) de cette enzyme. On peut se demander en effet si la présence de l'OAT dans des tissus aussi divers, dans des types cellulaires bien différents s'accompagne d'une fonction spécifique ? Beaucoup d'arguments convergent vers une spécificité fonctionnelle, chaque organe possédant son propre équipement enzymatique, ses propres substrats et ses propres régulations hormonales. Après avoir décrit la réaction catalysée par l'OAT nous nous attacherons donc à détailler les spécificités tissulaires de cette enzyme.*

## II.3 - Réaction catalysée par l'OAT

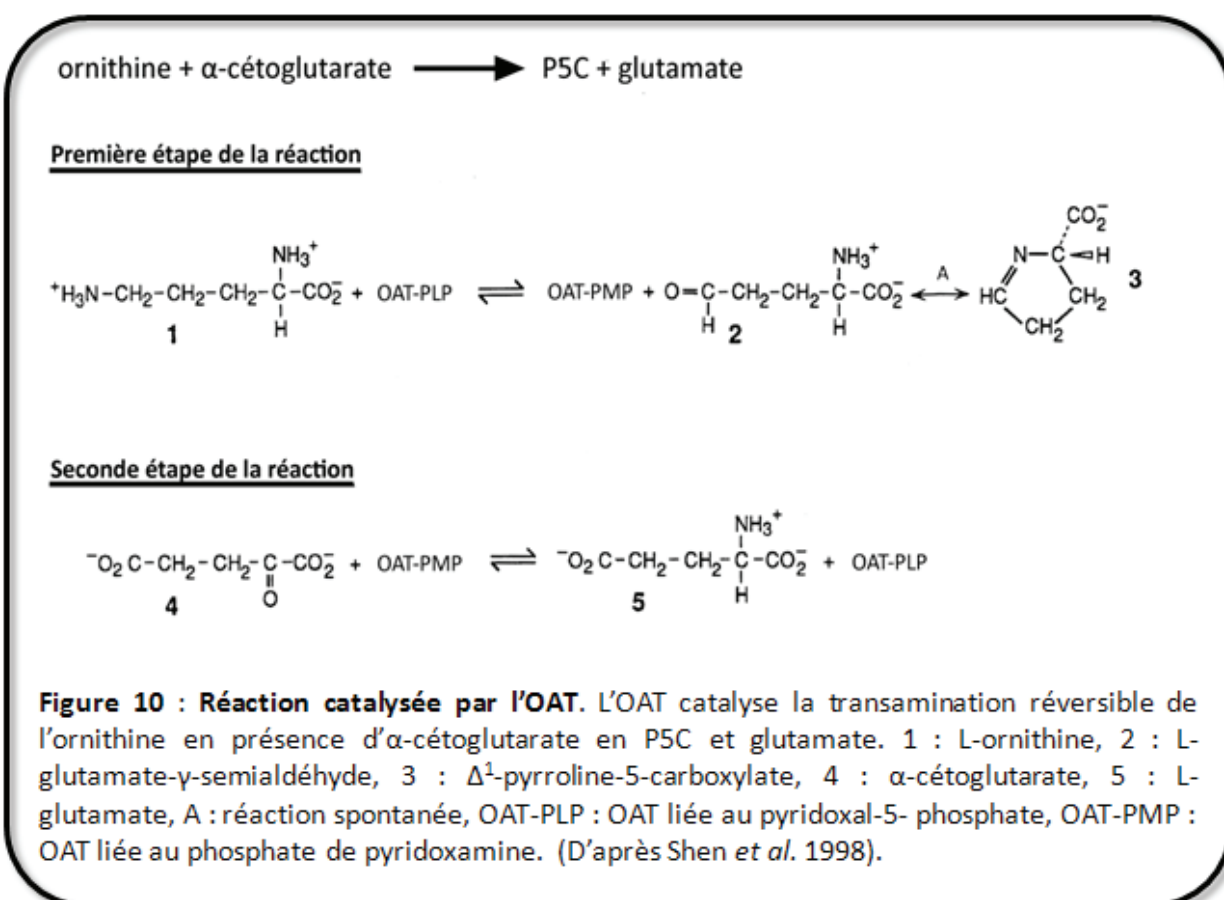
L'OAT catalyse la transamination réversible de l'ornithine en glutamate semi-aldéhyde, et de l' $\alpha$ -cétooglutarate en glutamate. Elle participe donc au catabolisme et à l'anabolisme de l'ornithine.

### II.3.1 - La réaction enzymatique

L'OAT est une  $\delta$ -aminotransférase qui comme toutes les transaminases, agit selon un mécanisme de type ping-pong en deux étapes. Classiquement, les transaminases assurent les échanges d'azote entre un acide  $\alpha$ -aminé (donneur) et un acide  $\alpha$ -cétonique (accepteur).



L'acide aminé donneur devient alors un acide  $\alpha$ -cétonique tandis que l'acide  $\alpha$ -cétonique accepteur est transformé en acide aminé (Fig. 10).



Le cofacteur de cette réaction est le phosphate de pyridoxal (PLP), servant de transporteur intermédiaire du groupement aminé (Katunuma *et al.* 1964). Ces enzymes sont donc impliquées soit dans la biosynthèse, soit dans le catabolisme des acides aminés selon la situation physiologique et l'organe considéré.

L'OAT présente pourtant une spécificité par rapport aux autres enzymes, le groupement aminé transféré à partir de l'ornithine n'est pas celui situé en position  $\alpha$  mais celui situé en position  $\delta$  de la fonction acide carboxylique.

Lors de la première étape de la réaction, l'OAT se lie à son cofacteur, le pyridoxal-5-phosphate (OAT-PLP), et réagit avec le L-ornithine, ce qui aboutit à la formation de phosphate de pyridoxamine liée à l'enzyme (OAT-PMP) et de L-glutamate- $\gamma$ -semialdéhyde qui se cyclise spontanément en  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate. Le substrat de la seconde étape de la réaction est l' $\alpha$ -cétoglutarate. Il est transaminé en L-glutamate par l'enzyme liée au phosphate de pyridoxamine. Cette dernière étape permet de restaurer le cofacteur sous sa forme pyridoxal-5-phosphate (Shen *et al.* 1998 ; Seiler 2000). Mueckler et Pitot (1985) ont émis l'hypothèse que

la séquence d'acides aminés 286 à 362 forme le site catalytique de l'OAT dans le foie de rat et que la lysine-292 est le site de fixation du pyridoxal-5-phosphate. Une étude plus récente (Markova *et al.* 2005) a montré l'importance de deux tyrosines présentes dans le site actif de l'enzyme qui déterminent son affinité pour l'ornithine. En effet, la mutation d'une seule de ces tyrosines en isoleucine diminue l'affinité de l'OAT pour l'ornithine d'un facteur 1000.

*In vitro*, il semble que la réaction catalysée par l'OAT soit orientée dans le sens de la formation de glutamate en raison de la conversion spontanée du L-glutamate- $\gamma$ -semialdéhyde en  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate (Jones 1985). Cette cyclisation spontanée du L-glutamate- $\gamma$ -semialdéhyde en  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate entraîne une confusion quant au produit final de la réaction enzymatique. Ainsi, dans la littérature, le  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate et le L-glutamate- $\gamma$ -semialdéhyde sont indifféremment présentés comme le produit final de la réaction catalysée par l'OAT. *In vivo*, l'orientation de la réaction enzymatique semble être déterminée non seulement par la concentration tissulaire en substrats (ornithine,  $\alpha$ -cétoglutarate, glutamate et P5C), mais aussi par l'affinité de l'enzyme pour ses substrats ou bien encore par la compétition pour l' $\alpha$ -cétoglutarate entre l'OAT et d'autres enzymes du cycle de l'urée ou le cycle de Krebs, par exemple. Cependant, la littérature montre que la réaction semble généralement se faire dans le sens du catabolisme de l'ornithine. En effet, chez des patients atteints d'atrophie gyrée de la choroïde, pathologie caractérisée par un déficit en OAT, une hyper-ornithinémie tissulaire, urinaire et sanguine est mesurée (Simell & Takki 1973 ; Valle *et al.* 1977 ; Sipilä *et al.* 1981 ; Wang *et al.* 1995).

### **II.3.2 - Inhibition de l'activité OAT**

La réaction enzymatique catalysée par l'OAT peut être inhibée par plusieurs agents pharmacologiques.

La gabaculine est une molécule qui a été isolée pour la première fois en 1977 à partir de *Streptomyces toyocaensis* (Kobayashi *et al.* 1977). Jung et Seiler (1978) ont été les premiers à mettre en évidence *in vivo* et *in vitro* l'inhibition irréversible de l'activité OAT par la gabaculine dans le foie et le cerveau de rat Sprague-Dawley et de souris CD1. Alonso et Rubio (1989) ont obtenu des résultats similaires chez des souris mâles Swiss OF1. Ainsi, l'administration d'une dose de gabaculine de 10 mg/kg de souris inhibe en moins d'une heure plus de 90% de l'activité OAT hépatique, rénale, musculaire et intestinale. En revanche, pour inhiber dans les mêmes

proportions l'activité OAT du cerveau, une dose 30 fois plus importante de gabaculine est requise. De plus, la persistance de l'inhibition de l'activité OAT lors de l'injection d'une forte dose (50 mg/kg) de gabaculine à des souris (<15% d'activité recouverts en 9 heures) confirme l'irréversibilité de l'inhibition de la réaction enzymatique. Lors de cette étude, l'inhibition de l'activité OAT par la gabaculine s'accompagne d'une accumulation d'ornithine dans le foie, l'intestin, les muscles, le rein et le cerveau des souris mâles. Ces propriétés font que la gabaculine a été largement utilisée dans plusieurs études comme inactivateur spécifique de l'OAT (Daune & Seiler 1988 ; Shah *et al.* 1997 ; O'Sullivan *et al.* 1998 ; Levillain *et al.* 2000).

Une autre molécule, la canaline est utilisée *in vitro* depuis 1964 pour ses effets inhibiteurs importants puisque l'ajout de 0,5 mM de canaline au milieu de réaction permet d'inhiber 95% de l'activité OAT hépatique du rat (Katunuma *et al.* 1964). Son mécanisme d'action a été décrypté un peu plus tard (Kito *et al.* 1978). Sa très forte homologie structurale avec l'ornithine lui permet d'entrer en compétition et de se fixer de façon irréversible au pyridoxal-5-phosphate pour former un oxamine. Le pyridoxal-5-phosphate rendu ainsi non disponible, la réaction enzymatique ne peut se poursuivre. Cet inhibiteur a été utilisé par la suite dans de nombreuses études chez l'animal comme pour le végétal (Kekomäki *et al.* 1969 ; Wroblewski *et al.* 1985 ; Aniento *et al.* 1988 ; Rosenthal & Dahlman 1990 ; Shah *et al.* 1997).

Enfin, en raison de son homologie structurale avec l'ornithine, le 5-fluoromethylornithine, est aussi un puissant inhibiteur *in vivo* et *in vitro* de l'activité OAT (Daune *et al.* 1988 ; Seiler *et al.* 1992 ; Therrien *et al.* 1994 ; Storici *et al.* 1999)

### II.3.3 - Spécificités tissulaires de la réaction enzymatique

Bien que, selon la littérature, la réaction enzymatique catalysée par l'OAT soit réversible, elle semble ne se produire que dans un seul sens dans chaque organe.

Ainsi, le métabolisme oxydatif **des tubules rénaux** a été étudié chez la souris femelle Swiss OF1, en présence ou non de gabaculine, un inactivateur spécifique de l'OAT (Levillain *et al.* 2000). Une forte production de  $^{14}\text{CO}_2$  à partir de  $[1-^{14}\text{C}]$  ornithine a été mesurée dans les tubules rénaux. L'ajout de DFMO ( $\alpha$ -difluoromethylornithine), un inhibiteur spécifique de l'ODC, ne modifie pas la production de  $^{14}\text{CO}_2$ . En revanche, lorsque la gabaculine est ajoutée, la production de  $^{14}\text{CO}_2$  est significativement diminuée. Ces résultats confirment que la réaction

catalysée dans le rein par l'OAT se fait en faveur du catabolisme de l'ornithine et de la synthèse de glutamate.

Nous avons rapporté un fort dimorphisme sexuel de l'OAT tant au plan de son expression qu'au plan de sa localisation dans le rein de souris. Il en résulte un métabolisme de l'ornithine propre à chaque sexe en fonction de l'équipement enzymatique du segment du néphron où l'OAT est synthétisée. Chez le mâle, l'activité de l'ODC dans le tube proximal serait plus importante que l'activité de l'OAT dans la médulla, ce qui entraînerait une utilisation préférentielle de l'ornithine pour la synthèse des polyamines (Kuo & Darnell 1989 ; Lie-Venema *et al.* 1997). La finalité de cette synthèse accrue de polyamines reste cependant inexpliquée. Chez la femelle, l'activité ODC est moins importante (Levillain *et al.* 2000) et l'OAT présente le même profil d'expression et la même localisation que l'arginase. La glutamine synthétase étant exprimée tout au long du néphron proximal, cette colocalisation favoriserait la synthèse de glutamine à partir d'arginine et d'ornithine (Burch *et al.* 1978 ; Levillain *et al.* 2004).

Enfin, la présence de glutamate déshydrogénase dans tous les segments du néphron aussi bien chez le mâle que chez la femelle contribue à la disponibilité en  $\alpha$ -cétooglutarate et en ions ammonium permettant ainsi d'alimenter le cycle de Krebs.

**Dans le foie**, la réaction catalysée par l'OAT se déroule dans le sens de la dégradation de l'ornithine et de la synthèse de glutamate. En effet, l'injection d'une dose de 50 mg / kg de gabaculine entraîne chez des souris mâles de souche Swiss OF1 une augmentation de la concentration hépatique de l'ornithine d'un facteur 8 (Alonso & Rubio 1989). De plus, la production hépatique de  $^{14}\text{CO}_2$  à partir de  $[1\text{-}^{14}\text{C}]$  ornithine est fortement diminuée lors de l'injection de gabaculine aux animaux. La compartimentation de l'expression de l'OAT dans les hépatocytes péri-veineux permettrait de fournir le glutamate nécessaire à la synthèse de glutamine par la glutamine synthétase (GS) localisée dans ces même hépatocytes (Kuo *et al.* 1991). L'OAT participerait ainsi à la détoxification de l'ammoniaque ayant échappé à l'uréogénèse dans les hépatocytes péri-portaux.

**Dans l'intestin**, à l'inverse de ce qui est observé dans le foie et le rein, la réaction enzymatique catalysée par l'OAT se fait dans le sens du catabolisme du glutamate et de la synthèse d'ornithine. En effet, des études *in vivo* et *in vitro* de perfusion d'intestin avec de la L-[U- $^{14}\text{C}$ ]glutamine ont démontré que cet acide aminé est utilisé comme précurseur de nombreux métabolites (citrulline, proline, acide organique...) (Windmueller & Spaeth 1974 ; Ross *et al.* 1978 ; Windmueller & Spaeth 1980), et que l'intestin possède toute la machinerie enzymatique

nécessaire à la synthèse d'ornithine (Herzfeld & Raper 1976b ; Ross *et al.* 1978 ; Jones 1985). De nombreux travaux (Windmueller & Spaeth 1974 ; Ross *et al.* 1978 ; Jones 1985 ; Wu *et al.* 1994) ont montré l'existence d'une synthèse endogène de citrulline à partir de glutamine impliquant les actions successives de la glutaminase et de l'OAT. Cette conversion est particulièrement importante :

- en période néonatale où l'intestin est responsable de la synthèse d'arginine. Une forte diminution des concentrations plasmatiques d'arginine et de citrulline est en effet observée 12 heures après avoir administré de la gabaculine chez le porcelet (Flynn & Wu 1996) ;
- chez l'adulte, où la production de citrulline à partir de la glutamine *via* l'OAT participe pour une large part à la synthèse globale d'arginine.

Cette différence d'orientation de la réaction catalysée par l'OAT dans l'intestin (glutamate vers ornithine) et dans le foie et les reins (ornithine vers glutamate) ne dépendrait pas de propriétés cinétiques, électrophorétiques ou immunologiques différentes de l'enzyme (Sanada *et al.* 1970) mais de spécificités métaboliques tissulaires. Les transaminases sont en effet régulées par la disponibilité en substrats. L'orientation de la réaction de l'OAT dans un tissu donné dépendrait donc de la présence et de l'activité des autres enzymes de la voie métabolique qui génèrent ces substrats. Par exemple, la P5C déshydrogénase, enzyme catalysant la conversion du P5C en glutamate est pratiquement absente de l'intestin mais fortement exprimée dans le rein et le foie. A l'inverse, l'intestin est pratiquement le seul organe à présenter une forte activité P5C synthase qui permet la synthèse du P5C à partir du glutamate (Wakabayashi *et al.* 1991).

*L'OAT se trouve donc au carrefour du métabolisme de la glutamine et de l'arginine, deux précurseurs importants des différentes voies métaboliques qui assurent l'homéostasie azotée. Son activité est complètement liée à la présence et à l'activité des enzymes de ces voies métaboliques qui signent la spécificité de la réponse tissulaire. Le schéma se complique encore si l'on considère qu'à ces spécificités d'action tissulaire, s'ajoutent des spécificités tissulaires de régulation de l'OAT tant par les hormones que par les apports protéiques.*

## II.4 – Régulation de l'expression de l'OAT

Chaque organe ou tissu qui synthétise l'OAT est un organe-cible pour de nombreuses hormones, ce qui implique que la régulation de l'OAT diffère d'un organe à l'autre.

### II.4.1 - Régulation hormonale

#### *II.4.1.1 - Régulation de l'expression de l'OAT rénale*

Nous avons déjà mentionné qu'il existe un fort dimorphisme sexuel de l'expression de l'OAT dans le rein et particulièrement chez le rat et la souris. Des études au cours de l'ontogenèse du rat ont montré que le dimorphisme sexuel concernant l'activité de l'OAT apparaissait au moment de la puberté et qu'il était lié directement aux hormones sexuelles (Herzfeld & Knox 1968). L'ovariectomie de jeunes rattes réduit en effet l'expression de l'OAT rénale à un niveau similaire à celui des mâles et prévient la mise en place du dimorphisme sexuel rénal de l'expression de l'OAT. En revanche, l'orchidectomie de jeunes rats mâles n'altère pas l'expression de leur OAT rénale. L'injection de testostérone chez la ratte ne modifie pas le niveau d'expression de l'OAT rénale, alors que l'injection d'œstradiol chez le rat mâle multiplie par 5 le niveau d'OAT rénale, qui devient équivalent à celui des femelles (Herzfeld & Knox 1968). Ces résultats indiquent l'existence, d'une régulation de l'expression de l'OAT rénale par les œstrogènes chez le rat. De plus, des travaux *in vitro* sur des cellules rénales de rats mâles ayant reçu une injection de  $17\beta$ -œstradiol, 20 heures avant le prélèvement, révèlent que les œstrogènes régulent l'expression de l'OAT rénale au niveau transcriptionnel (Wu 1979 ; Mueckler *et al.* 1984 ; Mueckler & Pitot 1983).

Cependant, cette régulation par les hormones sexuelles est spécifique de l'espèce étudiée. Chez la souris, le dimorphisme sexuel de l'expression de l'OAT est présent dans le rein, mais l'expression de l'OAT rénale murine est régulée par la testostérone. En effet, l'injection de testostérone chez des souris femelles diminue l'expression de l'OAT rénale (Manteuffel-Cymborowska *et al.* 1995 ; Levillain *et al.* 2005). L'orchidectomie de souris mâles entraîne quant à elle une augmentation de l'expression protéique de l'OAT rénale ; augmentation qui est inhibée, de façon dose dépendante, par l'injection de propionate de testostérone (Levillain *et al.* 2005b). Malgré ces différences de régulation inter-espèces, il faut noter que l'expression rénale de l'OAT est toujours plus importante chez les femelles.

Les hormones sexuelles ne sont pas les seuls facteurs de régulation de l'expression de l'OAT rénale. Les hormones thyroïdiennes régulent positivement l'expression de l'OAT rénale chez le rat (Mueckler & Pitot 1983 ; Mueckler *et al.* 1984). L'injection intrapéritonéale de 3,5,3'-tri-iodo-L-thyronine ( $T_3$ ) chez des rats mâles, pendant 4 jours consécutifs, double l'expression protéique de l'OAT rénale et son activité alors qu'une thyroïdectomie la diminue de moitié. L'injection post-thyroïdectomie de  $T_3$  pendant 4 jours restaure l'expression de l'OAT rénale à son niveau basal (Lyons & Pitot 1977) prouvant l'importance de la  $T_3$  dans les mécanismes de régulation de l'OAT. Elle agirait directement sur la transcription du gène par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires fonctionnant comme des facteurs de transcription activés par la liaison de leur ligand ou bien directement au niveau du gène lui-même *via* la probable séquence THRE.

#### *II.4.1.2 - Régulation de l'expression de l'OAT hépatique*

Contrairement à ce qui est observé dans le rein, les hormones sexuelles et les hormones thyroïdiennes n'ont aucun effet sur l'expression de l'OAT hépatique. En effet, l'injection intrapéritonéale de  $T_3$  ne modifie ni l'abondance relative des ARNm codant pour l'OAT (Shull *et al.* 1995b), ni l'activité OAT hépatique chez des rats mâles (Lyons & Pitot 1977). De plus, une gonadectomie suivie de l'administration d'une dose de testostérone ou d'une dose de  $17\beta$ -œstradiol à des rats mâles et femelles ne modifient pas l'expression de l'OAT hépatique (Herzfeld & Knox 1968). En revanche, l'analyse fonctionnelle des séquences 5' flanquantes du promoteur de l'OAT a montré la présence de motifs reconnus par les récepteurs de l'acide rétinoïque (Shull *et al.* 1995a). Curieusement, alors que l'acide rétinoïque est sans effet sur l'activité de l'OAT rénale, il stimule sa transcription dans le foie (Shull *et al.* 1995b). Cet effet stimulateur est toutefois inhibé en présence de  $T_3$  chez le rat mâle (Shull *et al.* 1995b).

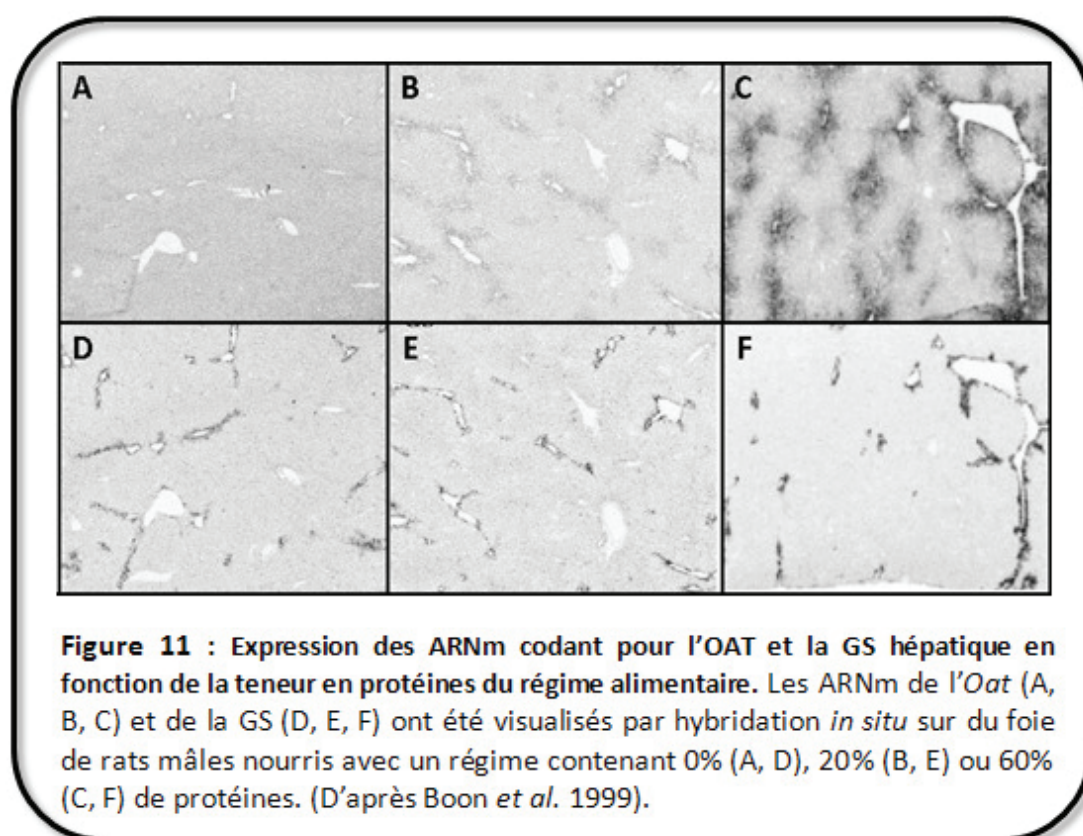
Le glucagon est la seule hormone qui régule clairement l'expression de l'OAT hépatique du rat. En effet, la pancréatectomie de ratte de souche Sprague Dawley diminue d'un facteur 4 l'activité OAT hépatique de ces animaux (Nakajima & Ishikawa 1971). L'injection de glucagon triple l'activité OAT hépatique de rats femelles et double celle de rats mâles (Nakajima & Ishikawa 1971 ; Lyons & Pitot 1976 ; Hunter & Harper 1977). Plus précisément, chez le rat, le glucagon augmente d'un facteur 10 le taux de synthèse de l'OAT, d'un facteur 2 le taux d'élongation des chaînes polypeptidiques et augmente d'un facteur 23 le nombre relatif de ribosomes présents sur un ARNm d'OAT (Mueckler *et al.* 1983). Ces résultats prouvent que du



moins chez le rat, l'OAT hépatique est régulée au niveau traductionnel et post-traductionnel par le glucagon.

#### II.4.2 - Régulation de l'expression de l'OAT par les apports protéiques de la prise alimentaire

Les protéines alimentaires sont une source vitale d'acides aminés, et de larges modifications de la prise alimentaire ou de l'apport protéique journalier modifie l'expression de l'OAT. En effet, plusieurs études ont montré que l'enrichissement en protéines du régime alimentaire augmente l'activité OAT hépatique des rats (Pitot & Peraino 1963 ; Brennan *et al.* 1970 ; Mueckler *et al.* 1983 ; Matsuzawa *et al.* 1994 ; Boon *et al.* 1999). De plus, cette augmentation de l'expression de l'OAT hépatique est proportionnelle à la teneur en protéines du régime alimentaire (Fig. 11).



Ainsi, en fonction de la souche de rats utilisée (SD/An1, Wistar...) et du contenu protéique du régime alimentaire (60% ou 90%) l'activité OAT est augmentée d'un facteur 10 à 100 par comparaison avec des animaux soumis à un régime standard. De même, lorsque les animaux sont nourris avec un aliment dépourvu de protéines, une activité OAT hépatique très faible, voire nulle, est mesurée. Cette modification de l'activité OAT induite par la teneur en protéines



du régime alimentaire se produit très rapidement, en général, 12 heures seulement après le changement de régime alimentaire (Pitot & Peraino 1963).

Deux agents, la puromycine, un inhibiteur de la traduction, et l'actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, peuvent prévenir l'augmentation de l'activité OAT hépatique chez des rats nourris avec un régime contenant 90% de protéines (Pitot & Peraino 1963). C'est vingt ans plus tard que Mueckler et collaborateurs (1983) ont démontré, chez des rats mâles nourris avec un régime contenant 60% de protéines, que la synthèse des ARNm codant pour l'OAT augmente d'un facteur 38, que le nombre de chaînes naissantes sur chaque ARNm, *i.e.* le nombre de protéines synthétisées par brin d'ARNm, est augmenté d'un facteur 23 et que la vitesse de traduction des ARNm en protéine est multipliée par un facteur 2. La régulation de l'expression de l'OAT lors de l'enrichissement du régime alimentaire en protéines, se fait donc au niveau transcriptionnel et traductionnel. Cette régulation pourrait être médiée par le glucagon et l'AMPc. En effet, l'addition *in vitro* de glucagon et d'AMPc au milieu de culture d'hépatocytes isolés de foie de rats soumis à un régime hypoprotéiné, produit une augmentation de la traduction et de la transcription de l'OAT, au même titre qu'un régime hyperprotéiné (Merrill *et al.* 1985). La régulation de l'expression de l'OAT hépatique en fonction de la teneur en protéines du régime alimentaire permettrait une réponse adaptative à la surcharge azotée induite par la consommation excessive de protéines. En effet, l'augmentation de l'expression de l'OAT hépatique permet d'augmenter la production de glutamate et donc de glutamine *via* la glutamine synthétase. Cette synthèse de glutamine utilise l'ammoniaque qui n'a pas été métabolisé par la synthèse de l'urée, et permet de détoxifier l'organisme (Boon *et al.* 1999). Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'OAT et la GS sont colocalisées dans les hépatocytes périveineux (Fig. 11) (Kuo *et al.* 1991 ; Kuo & Darnell 1991 ; Boon *et al.* 1999), et le fait que les quantités d'ARNm de la GS et de l'OAT augmentent proportionnellement et de façon synchrone lors d'un régime hyperprotéiné (Boon *et al.* 1999).

## **II.5 - OAT et pathologies.**

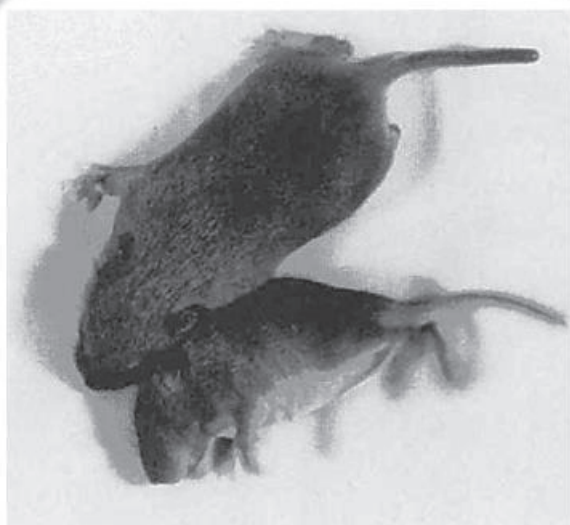
De plus en plus d'études mettent en évidence une modification de l'expression de l'OAT lors de l'analyse de certaines pathologies, indiquant ainsi l'importance majeure du contrôle de son activité dans les voies biosynthétiques.

## II.5.1 - L'atrophie gyrée chorio-rétinienne

### II.5.1.1 - Description de la pathologie

L'atrophie gyrée chorio-rétinienne est une pathologie qui affecte l'homme. Elle est caractérisée par une dégénérescence de la rétine et des troubles de la vision nocturne durant l'enfance, puis une perte progressive de la vue à l'âge adulte allant jusqu'à la cécité de l'individu (Valle *et al.* 1977 ; O'Donnell *et al.* 1977). Simell et Takki (1973) ont été les premiers à décrire une hyperornithinémie chez les patients atteints d'atrophie gyrée chorio-rétinienne et ont émis l'hypothèse d'une perturbation du métabolisme de l'ornithine (Takki & Simell 1974). Cette hypothèse a été confirmée quelques années plus tard par (O'Donnell *et al.* 1977 ; Valle *et al.* 1977). En effet, aucune activité OAT n'est mesurée dans des cultures de fibroblastes ou de lymphocytes issus de patients atteints d'atrophie gyrée chorio-rétinienne. Étonnamment, cette pathologie est principalement décrite chez des patients d'origine finlandaise ou suédoise.

### II.5.1.2 - Les souris $Oat^{-/-}$ , un modèle d'étude



**Figure 12 : Phénotype de souriceaux témoins ou invalidé pour le gène de l'Oat ( $Oat^{-/-}$ ).** En haut : souriceau contrôle ; en bas : souriceau  $Oat^{-/-}$ . (D'après Wang *et al.* 1995).

Face au faible nombre de patients atteints d'atrophie gyrée chorio-rétinienne, et aux difficultés d'obtention de prélèvements chez ces patients, des chercheurs ont créé la première souris invalidée pour l'expression du gène de l'OAT (Wang *et al.* 1995). L'activité OAT dans le foie, le rein et l'intestin des souris  $Oat^{+/-}$  est diminuée de 50% par rapport aux souris témoins. De plus, aucune activité OAT n'est mesurée dans les organes des souris  $Oat^{-/-}$ . Étonnamment, les souriceaux  $Oat^{-/-}$  ne s'alimentent pas, deviennent léthargiques et décèdent 24-48 heures après la

naissance (Fig. 12). En revanche, l'injection intra-péritonéale d'arginine (2 mmoles/kg) toutes les 12 heures pendant les 14 premiers jours de vie permet d'assurer un taux de survie des souriceaux de 80%. Au-delà de 14 jours de traitement, la supplémentation en arginine ne

s'avère plus nécessaire à la survie des souris *Oat<sup>-/-</sup>*. Toutefois, les souris *Oat<sup>-/-</sup>* supplémentées en arginine accusent un retard de croissance par rapport aux souris témoins (Fig. 12). Cette étude révèle que le gène de l'OAT n'est pas indispensable au développement embryonnaire des souris, mais qu'il est capital pour le développement postnatal des animaux.

Il n'en est pas de même chez l'homme, où le défaut total d'expression de l'OAT n'est pas létal. Cette différence est probablement liée au taux de croissance beaucoup moins élevé chez le nouveau-né humain qui nécessite donc un besoin en arginine moins important (Wang *et al.* 1995). Au contraire, chez le souris, la demande en arginine nécessaire à la synthèse protéique surpasse l'apport d'arginine par l'alimentation. La synthèse endogène d'arginine est donc indispensable chez le souris, comme chez le rat nouveau-né où une étude a montré que l'arginine est un des acides aminés dont la quantité utilisée pour la synthèse protéique dépasse la quantité apportée par l'alimentation, ce qui implique un apport indispensable par la synthèse endogène dans l'intestin (Davis *et al.* 1993).

### **II.5.2 - Les cancers**

L'analyse du métabolisme d'animaux porteurs de tumeurs a permis de mettre en évidence des modifications de l'expression de l'OAT. Les premières études chez le rat (Tomino *et al.* 1974) ont montré que l'activité OAT est augmentée dans un foie porteur de tumeur à croissance lente comme l'hépatome 44, et que l'activité OAT est diminuée dans un foie porteur de tumeur à croissance rapide comme l'hépatome 7777. Les propriétés physico-chimiques de l'OAT des animaux porteurs de tumeurs ne diffèrent pas de celles des animaux sains, suggérant que les modifications d'activité OAT observées dans les hépatomes sont dues à une modification de la régulation de la transcription et/ou de la traduction de l'*Oat*.

En effet, chez le rat atteint d'hépatome 44 d'agressivité faible, le taux de synthèse de l'OAT et le contenu en OAT sont respectivement 5 et 15 fois supérieurs à ceux des animaux sains, et le taux de dégradation de la protéine est 2 fois plus faible que celui des animaux sains (Kobayashi *et al.* 1976). Au contraire chez des rats porteurs de l'hépatome de Morris 7800, caractérisé comme agressif une forte diminution de l'activité OAT hépatique (- 46%) est observée en seulement 15 jours. L'activité OAT est également diminuée de 40% dans les reins et les muscles de ces rats. Une diminution de l'activité OAT accompagnerait donc de manière proportionnelle la prolifération tumorale. Certains évoquent un phénomène de compétition pour l'ornithine, la

diminution de l'activité de l'OAT favoriserait alors l'activation de l'ODC permettant la synthèse accrue des polyamines nécessaires à la prolifération tumorale (Tomino et al. 1974).

*De cette revue générale ressort la complexité des mécanismes de régulation de l'OAT et les variations de l'orientation de la réaction qu'elle catalyse en fonction de l'organe et du tissu considéré, ou de l'espèce animale. Toutefois, son implication dans le métabolisme de la glutamine et de l'arginine lui confère un rôle important dans le maintien de l'équilibre azoté. L'OAT est un lien entre deux acides aminés fondamentaux : **l'arginine** en tant que métabolite intermédiaire du cycle de l'ornithine est considéré comme indispensable chez la plupart des animaux bien portants et **la glutamine** en tant que principal transporteur inter-organe d'azote est un régulateur du métabolisme protéique et un substrat essentiel pour les cellules qui se multiplient rapidement. Chez le jeune animal, l'arginine est bien synthétisée par le rein comme chez l'adulte, mais à un taux qui n'est pas suffisant pour assurer la croissance rapide de l'organisme. En fait, le rein développe la capacité à synthétiser de l'arginine à partir de la citrulline seulement au moment du sevrage. Des analyses de la composition corporelle en acides aminés montrent pourtant que la biosynthèse endogène d'arginine est très élevée pendant la période d'allaitement de jeunes rats (Davis et al. 1993). Cette biosynthèse a été mise en évidence dans les villosités intestinales du rat nouveau-né (De Jonge et al. 1998), montrant ainsi que la capacité des organes à synthétiser l'OAT évolue au cours du développement pour s'adapter aux demandes métaboliques. Nous nous sommes donc intéressés à la régulation de l'OAT au cours de la croissance post-natale, période où l'animal, en particulier « altricial » comme la souris ou le rat (D'Udine & Gozzo 1983 ; Lamers et al. 2005), est soumis à une forte croissance nécessitant une synthèse accrue de protéines. Des facteurs thermiques et alimentaires peuvent augmenter encore les contraintes métaboliques auxquelles ces organismes doivent répondre.*

### III - OAT et développement post-natal

Du fait de leur immaturité à la naissance, les animaux « altriciaux » achèvent leur maturation au cours du développement postnatal. Cette période critique et hautement importante de la vie d'un individu est caractérisée par 3 grands événements qui peuvent être perçus comme des stress par l'individu. Ces événements sont : 1) la naissance accompagnée de l'émancipation thermique progressive des animaux liée au développement de la pilosité, 2) le sevrage lors du passage d'une alimentation de type lactée à une alimentation solide, 3) la puberté avec la maturation des organes sexuels et la mise en place de la sécrétion des hormones sexuelles.

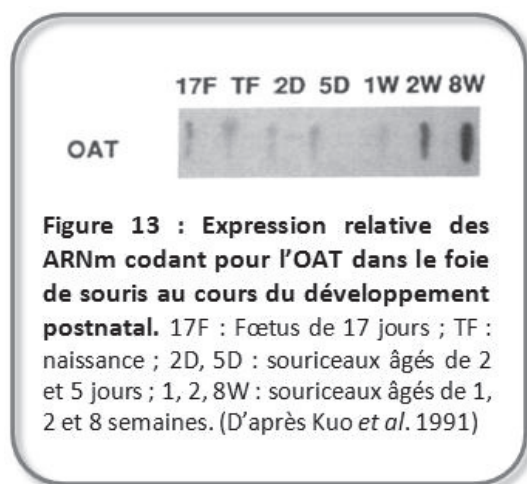
Ces contraintes métaboliques obligent l'animal à réguler finement ses flux inter-organes d'acides aminés. Nous avons vu précédemment que l'apport protéique ainsi que les hormones sexuelles modulent l'expression de l'OAT. Comment se comporte donc cette enzyme au cours du développement postnatal ?

#### III.1- Expression de l'OAT hépatique au cours de la croissance postnatale

Une étude assez sommaire montre que l'activité OAT hépatique, mesurée chez des rats mâles Sprague-Dawley âgés de 20 à 120 jours, augmente jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour de vie puis reste constante jusqu'à 120 jours (Volpe *et al.* 1969). Chez des rats de même souche, des travaux sur des stades plus précoces de développement ont mis en évidence la très faible activité OAT hépatique au cours du développement embryonnaire et durant les 15 premiers jours de vie. Puis, l'activité OAT est augmentée d'un facteur 20 en 15 jours avant de se stabiliser à partir du 30<sup>ème</sup> jour de vie (Räihä & Kekomäki 1968). Des résultats similaires sont observés chez des rats mâles et femelles de souche NEDH qui présentent une augmentation de l'activité OAT hépatique d'un facteur 25 durant les 35 premiers jours de vie (Herzfeld & Knox 1968). Ensuite, l'activité OAT diminue légèrement entre le 35<sup>ème</sup> et le 60<sup>ème</sup> jour, avant qu'elle se stabilise et qu'un dimorphisme sexuel de l'activité OAT apparaisse. Une étude plus sérieuse, réalisée toujours chez le rat mâle de souche NEDH pour déterminer avec précision les périodes de fluctuation de l'activité OAT (Herzfeld & Greengard 1969), a révélé que l'activité OAT est stable les 8 premiers jours de vie, augmente d'un facteur 10 de J8 à J15, puis augmente de façon plus graduelle jusqu'à J32, où l'activité OAT est similaire à celle des animaux adultes.

Certains auteurs se sont intéressés à d'autres espèces : chez le lapin, considéré également comme une espèce altriciale, l'activité OAT diminue d'un facteur 6 la première semaine de vie

par rapport à l'activité OAT mesurée chez le fœtus, puis reste stable jusqu'à la 5<sup>ème</sup> semaine. Elle augmente ensuite d'un facteur 10 les 5 semaines suivantes puis diminue progressivement à partir de la 10<sup>ème</sup> semaine de vie et se stabilise à partir de la 20<sup>ème</sup> semaine de vie du lapin (Shiono *et al.* 1982).



Chez la souris, l'expression de l'OAT au cours du développement post-natal a été étudiée par Northern-Blot (Fig. 13). Chez le fœtus, les ARNm codant pour l'OAT sont à peine détectables et c'est seulement après plusieurs semaines que l'expression relative de l'OAT atteint son pic (Kuo *et al.* 1991). De plus, le profil d'expression de la GS au cours du développement postnatal est identique à celui de l'OAT, ce qui confirme la

coopération de ces deux enzymes dans le foie pour synthétiser de la glutamine et le détoxifier.

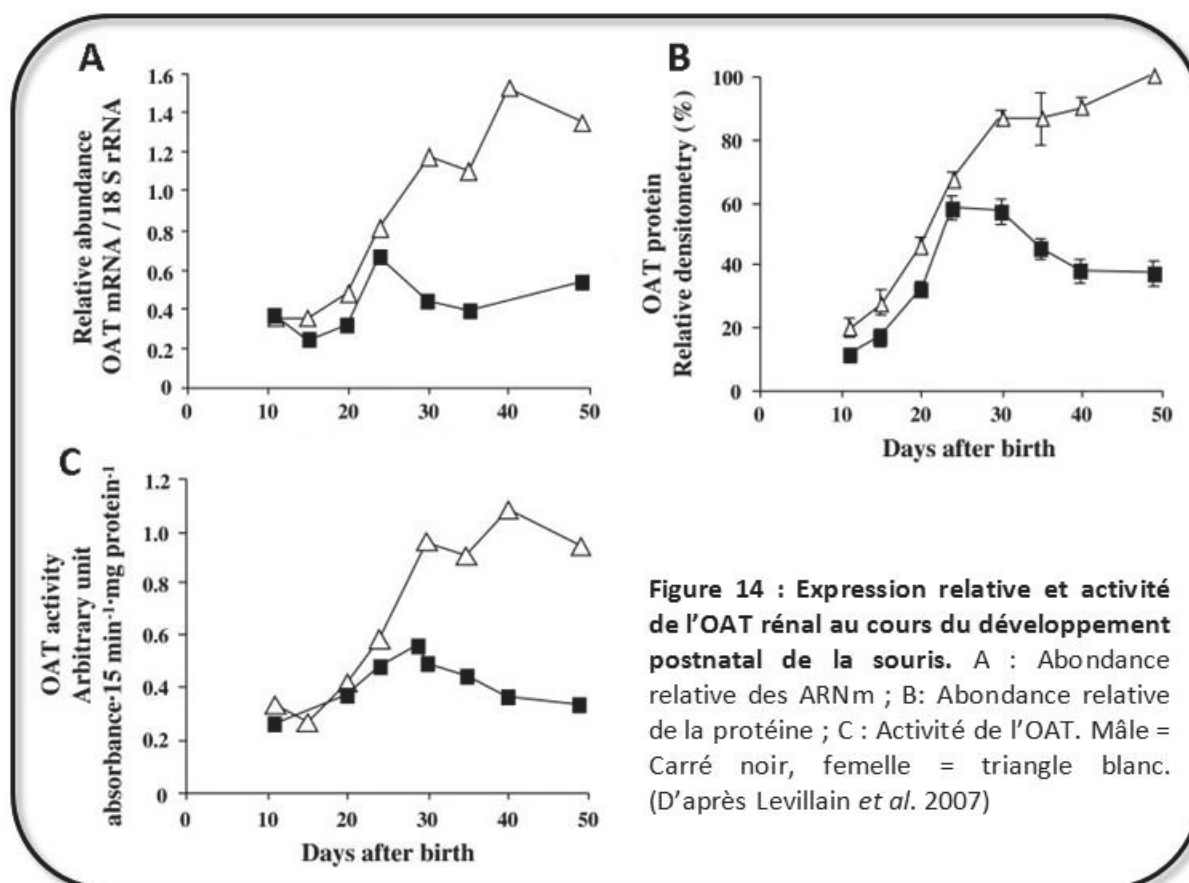
Cherchant un facteur de régulation, des auteurs ont soumis des rats Sprague-Dawley nouveau-nés (1-12 jours) à une injection de triamcinolone, un glucocorticoïde. Une injection unique provoque une augmentation de l'activité OAT hépatique d'un facteur 10 (Räihä & Kekomäki 1968). De manière plus précise, l'injection de triamcinolone stimule l'activité OAT hépatique tant que celle-ci n'a pas atteint la valeur de l'activité OAT mesurée dans le foie des animaux adultes. Des résultats similaires ont été obtenus chez des rats de souche NEDH âgés de 4 à 16 jours (Herzfeld & Greengard 1969). L'injection de triamcinolone provoque en 12 heures une augmentation de l'activité OAT qui atteint alors le niveau d'activité OAT hépatique des animaux adultes. Au-delà des 16 premiers jours de vie, l'injection de glucocorticoïde ne modifie plus l'activité OAT. Cette modulation de l'activité OAT par l'injection de glucocorticoïdes au cours du développement postnatal semble être due à des mécanismes de régulation de la traduction. En effet, l'injection combinée de triamcinolone et de puromycine, un inhibiteur de la traduction, n'a plus aucun effet sur l'activité OAT hépatique au cours du développement post-natal (Räihä & Kekomäki 1968). Une étude complémentaire aurait pu être réalisée en ajoutant cette fois un inhibiteur de la transcription comme l'actinomycine D à l'injection de glucocorticoïdes, ce qui aurait permis de mettre en évidence une éventuelle régulation précoce de l'OAT par ces glucocorticoïdes, à l'échelle transcriptionnelle.

### III.2 - Expression de l'OAT rénale au cours de la croissance postnatale

Chez des rats mâles de souche NEDH, l'activité OAT rénale augmente linéairement de 600 % les 60 premiers jours de vie jusqu'à atteindre la valeur d'activité OAT rénale mesurée chez les rats mâles adultes (Herzfeld & Knox 1968). Chez les rats femelles de la même souche, l'activité OAT est identique à celle des mâles dans les premiers jours, elle augmente beaucoup plus fortement (1400 %) puis se stabilise au 50<sup>ème</sup> jour de vie. A noter, qu'un dimorphisme sexuel de l'activité OAT apparaît à partir du 30<sup>ème</sup> jour. En effet, à ce stade de développement, l'activité OAT rénale des rats femelles est supérieure à celle des mâles. Ces mêmes résultats ont été obtenus au cours d'une étude beaucoup plus sérieuse (mesure de l'activité OAT rénale tous les 4 jours) et confirment l'apparition du dimorphisme sexuel au 30<sup>ème</sup> jour de vie avec une activité OAT au moins deux fois supérieure à celle des mâles (Herzfeld & Greengard 1969). Une étude réalisée sur le plus long terme, chez des rats mâles Sprague-Dawley, révèle que l'activité OAT augmente les 50 premiers jours puis reste parfaitement stable au moins jusqu'au 120<sup>ème</sup> jour de vie (Volpe *et al.* 1969).

Cette même étude montre que l'expression de l'OAT rénale au cours du développement postnatal est sous le contrôle des hormones sexuelles, puisque l'injection d'œstrogène augmente l'activité OAT rénale dès le 11<sup>ème</sup> jour de vie. Chez la souris Swiss OF1, l'étude de l'expression de l'*Oat* rénale au cours du développement postnatal montre un dimorphisme sexuel important. Le taux d'ARNm codant pour l'OAT est en effet quadruplé chez les femelles entre le 10<sup>ème</sup> et le 40<sup>ème</sup> jour de vie, alors qu'il est seulement doublé de J10 à J25 chez les mâles (Levillain *et al.* 2007). L'analyse de l'abondance de la protéine OAT et de son activité met en évidence des résultats similaires (Fig. 14). Ce dimorphisme sexuel en faveur des femelles se met en place à partir de J27-J30 au moment de la puberté et il est contrôlé par la testostérone (Levillain *et al.* 2007).





Cette revue de la littérature pourtant exhaustive souligne le peu d'informations qui concernent l'ontogenèse de l'OAT dans la période postnatale et surtout le manque de corrélation entre l'activité OAT et les modifications de l'état métabolique de l'animal au cours de sa croissance (émancipation thermique, sevrage). Nous avons ciblé ces étapes dans notre étude, c'est pourquoi il nous a paru nécessaire de rappeler dans cette revue bibliographique, les caractéristiques de la croissance postnatale chez la souris, notre animal modèle.

### III.3 – Modifications métaboliques lors de la croissance postnatale des souris

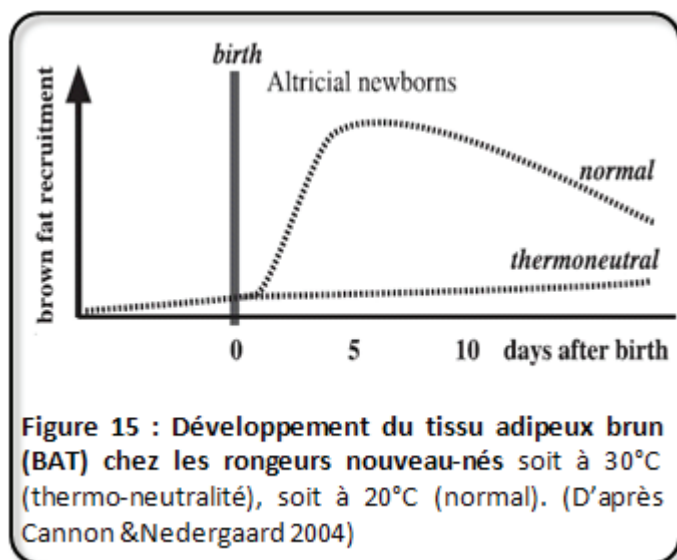
#### III.3.1 - L'émancipation thermique

La naissance occasionne un fort stress thermique qui induit des conséquences métaboliques. En effet, bien que nos animaleries soient maintenues à une température constante et comprise entre 22-30°C, le souriceau nouveau-né, dépourvu de poils, est exposé à une température ambiante inférieure à celle de l'utérus où il s'est développé. Pour lutter contre ce stress thermique, la première solution adoptée par les souriceaux est une réponse comportementale. En effet, la mère regroupe ses petits dans un « nid » pour les maintenir isolés le plus possible de l'environnement extérieur. De plus, en se regroupant les uns contre les autres, les animaux



diminuent fortement les pertes thermiques par convection (Canals *et al.* 1997 ; Gilbert *et al.* 2010).

Ce comportement «solidaire» n'est cependant pas suffisant pour maintenir l'homéostasie thermique de l'animal. La thermogénèse postnatale est assurée par le développement rapide



du tissu adipeux brun (BAT) dès les premiers jours de vie (Cannon & Nedergaard 2004) (Fig. 15). On peut alors estimer que de grandes quantités de substrats énergétiques sont nécessaires à la pérennisation des processus thermogènes nécessaires au maintien de l'homéostasie thermique du jeune animal.

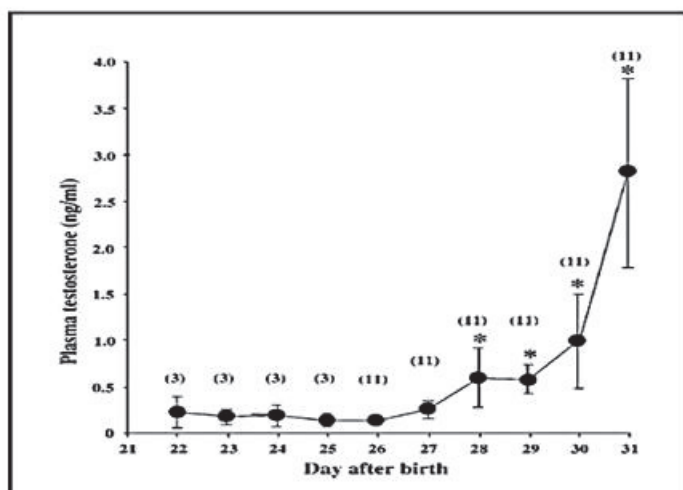
### III.3.2 - Le sevrage des animaux

Chez les souris de laboratoire, le sevrage est effectué en général à l'âge de 21 jours. Les animaux doivent alors s'alimenter seuls et passent d'une alimentation liquide lactée à une alimentation solide de type croquette. Nous avons mentionné précédemment que l'OAT est régulée par les apports protéiques. Or, le changement d'alimentation des souriceaux provoque une modification importante des apports protéiques. En effet, l'analyse de la composition du lait de souris femelles de souche ICR, BALB/c et FVB/N révèle que le lait est composé en moyenne de 10,8% de protéines, de 21,3% de lipides et le reste de glucides et d'éléments minéraux (Yajima *et al.* 2006). Même si la composition de l'aliment distribué en animalerie varie d'un fournisseur à l'autre, la teneur moyenne en protéines des croquettes est de 18-20% soit le double de la teneur en protéines du lait. Cette consommation accrue de protéines modifie donc le métabolisme azoté des animaux et entraîne sûrement l'intervention de l'OAT pour maintenir constant le pool des acides aminés et l'homéostasie azotée. Curieusement, aucune donnée bibliographique ne se rapporte à ce sujet chez la souris.

### III.3.3 - La puberté

Chez les animaux, la puberté se caractérise de manière générale par la maturation des organes reproducteurs, la mise en place de la sécrétion des hormones sexuelles et l'acquisition de la capacité à se reproduire.

Chez la souris mâle, la puberté se produit, de manière générale, entre le 25<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> jour de vie. En effet, chez des souris mâles de souche Swiss OF1, la testostéronémie augmente significativement à l'âge de 27 jours (Levillain *et al.* 2007). Chez des souris mâles de souche CD1 l'augmentation significative de la sécrétion de testostérone se produit au 28<sup>ème</sup> jour de vie et correspond à la maturation des testicules (Fig 16) (Wu *et al.* 2010).



**Figure 16 : Concentration plasmatique de la testostérone.** Concentration chez des souris Swiss OF1 mâles âgées de 22 à 31 jours (D'après Levillain *et al.* 2007).

Chez la souris femelle, la puberté se produit entre le 25<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> jour de vie. Elle correspond à l'apparition des premières chaleurs et à l'ouverture vaginale. Ces deux paramètres témoignent de la mise en place de la sécrétion des hormones sexuelles (Drickamer 1975 ; Drickamer 1983). Ainsi chez des souris femelles de souche ICR/Jcl, les premières chaleurs et

l'ouverture vaginale se produisent entre le 26<sup>ème</sup> et le 30<sup>ème</sup> jour de vie (Drickamer 1975 ; Honma *et al.* 2002). Chez des souris femelles C57Bl/6J, la concentration sérique en œstradiol augmente à partir du 26<sup>ème</sup> - 28<sup>ème</sup> jour de vie (Ahima *et al.* 1997).

Cette imprégnation hormonale produit un dimorphisme sexuel chez les souris femelles qui présentent un taux d'OAT rénal bien supérieur à celui des mâles (§III.2). Qu'en est-il au niveau des autres organes ? Comment sont régulés les flux inter-organes d'acides aminés ? Par quelle voie métabolique ? Toutes ces questions restent sans réponse, ce qui justifie l'intérêt que nous avons porté à la période post natale dans nos travaux.

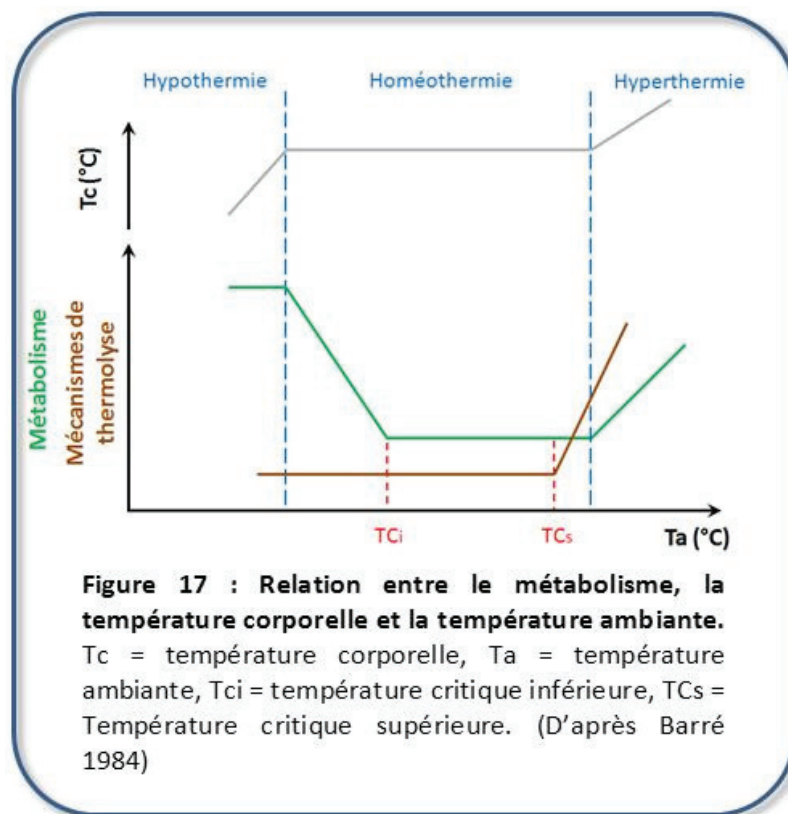
## IV - OAT et acclimatation au froid

Le froid représente un stress majeur pour les organismes endothermes qui maintiennent leur température corporelle à un niveau élevé et constant. Pour éviter l'hypothermie, les endothermes déclenchent une thermogenèse de régulation d'abord liée à la thermogenèse de frisson. Si l'exposition au froid se prolonge, des processus durables se mettent en place pour augmenter le métabolisme basal et le développement d'une thermogenèse sans frisson ou NST (Non Shivering Thermogenesis des auteurs anglo-saxons). Chez les petits mammifères, le tissu adipeux brun (BAT) est le principal organe thermogène grâce à ses nombreuses mitochondries qui expriment une protéine découplante UCP1 (Uncoupling Protein 1).

L'acclimatation au froid s'accompagne d'un accroissement du métabolisme des lipides et des glucides pour fournir les substrats énergétiques nécessaires aux processus thermogènes. L'incidence d'une exposition au froid sur le métabolisme des acides aminés reste peu explorée. Pourtant, chez le rat, le BAT augmente son captage de glutamine, glutamate, alanine, leucine, isoleucine et thréonine et augmente sa libération de proline et de glycine (López-Soriano *et al.* 1987). S'il est connu que le BAT exprime de nombreuses enzymes, le métabolisme d'acides aminés importants comme l'arginine, l'ornithine et la glutamine n'a jamais été étudié ni au froid ni dans les organes thermogènes. Il s'avère alors intéressant d'explorer l'activité OAT dans ces organes puisque cette enzyme contrôle la réaction biochimique qui relie l'arginine et la glutamine, deux acides aminés au carrefour de multiples voies métaboliques. Après un bref rappel sur la thermogenèse de régulation, nous nous attacherons à analyser les conséquences de l'exposition au froid qui pourrait induire une régulation spécifique de l'OAT pour le maintien de l'équilibre azoté.

### IV.1 - Homéothermie et températures critiques

Lorsque la température ambiante dépasse une valeur appelée température critique supérieure (TCs), les endothermes activent leurs mécanismes de thermolyse (pertes par évaporation, vasodilatation périphérique, augmentation de la fréquence cardiaque et respiratoire...) pour maintenir leur température corporelle constante (Fig. 17). A l'inverse, en deçà d'une température appelée température critique inférieure (TCi) les endothermes activent leur métabolisme pour produire de la chaleur (thermogenèse de régulation) et maintenir leur température corporelle constante.



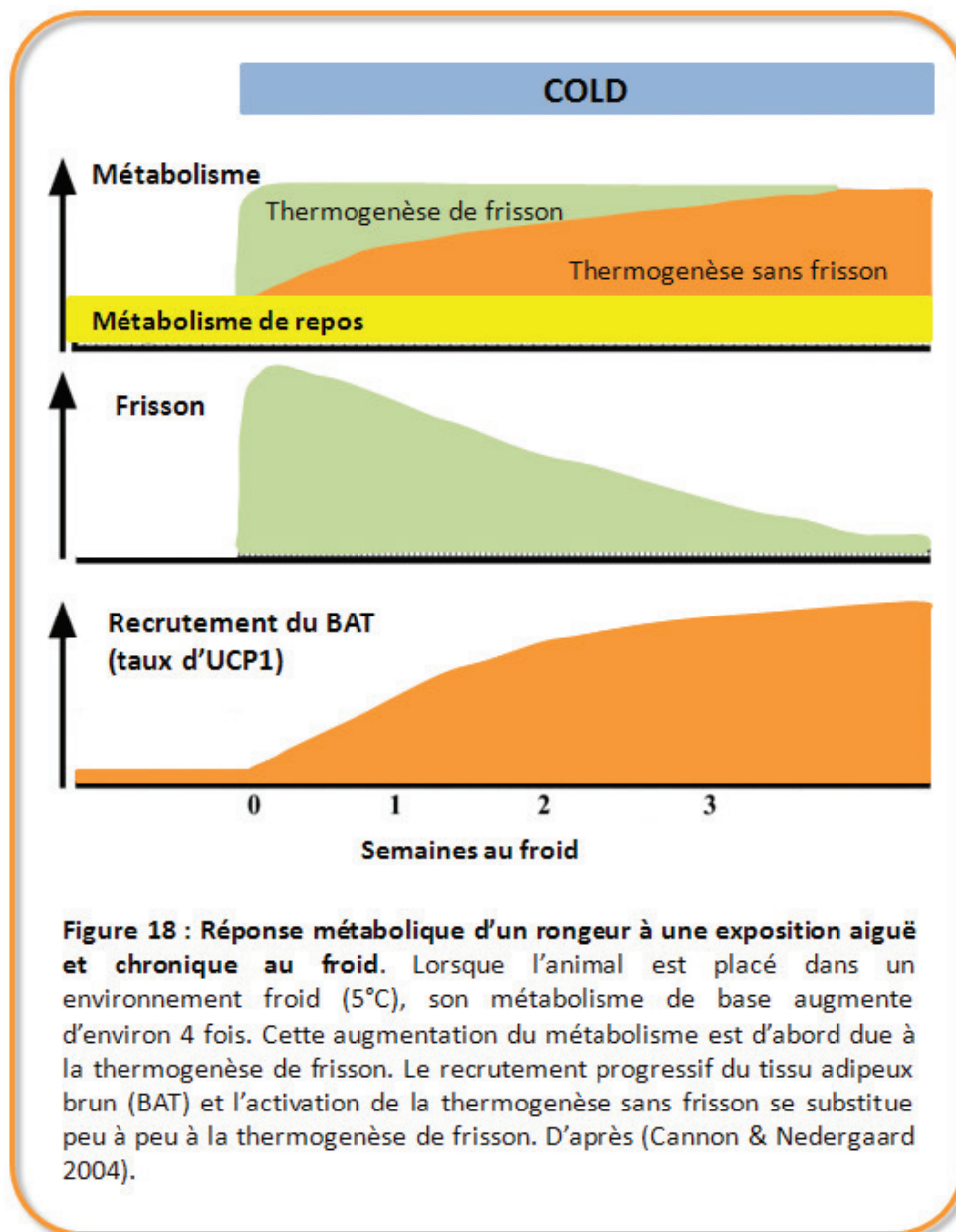
## IV.2- Thermogenèse de régulation

Lorsque des endothermes se retrouvent confrontés à un stress froid, la première stratégie adoptée est une stratégie comportementale. En effet, des mécanismes d'évitement du stress à « faible coût énergétique », comme l'enfouissement, la posture en boule, la torpeur... ont été observés. Si cette stratégie ne s'avère pas suffisante au maintien de l'homéothermie, les endothermes activent leur thermogenèse de régulation. En réponse à une exposition aiguë à un stress froid, les endothermes activent leur thermogenèse de frisson. Si l'exposition au froid se prolonge, on observe chez les rongeurs le développement d'une thermogenèse sans frisson.

### IV.2.1 - Thermogenèse de frisson

Chez les endothermes, la thermogenèse de régulation repose dans un premier temps sur la thermogenèse de frisson. Le frisson thermique, caractéristique d'une réponse aiguë au froid, est déclenché et maintenu par des effecteurs nerveux : les motoneurones  $\alpha$  qui interviennent également dans la motricité volontaire. Ce sont les centres thermorégulateurs hypothalamiques qui activent ces motoneurones  $\alpha$  (Morrison *et al.* 2008). Il en résulte des

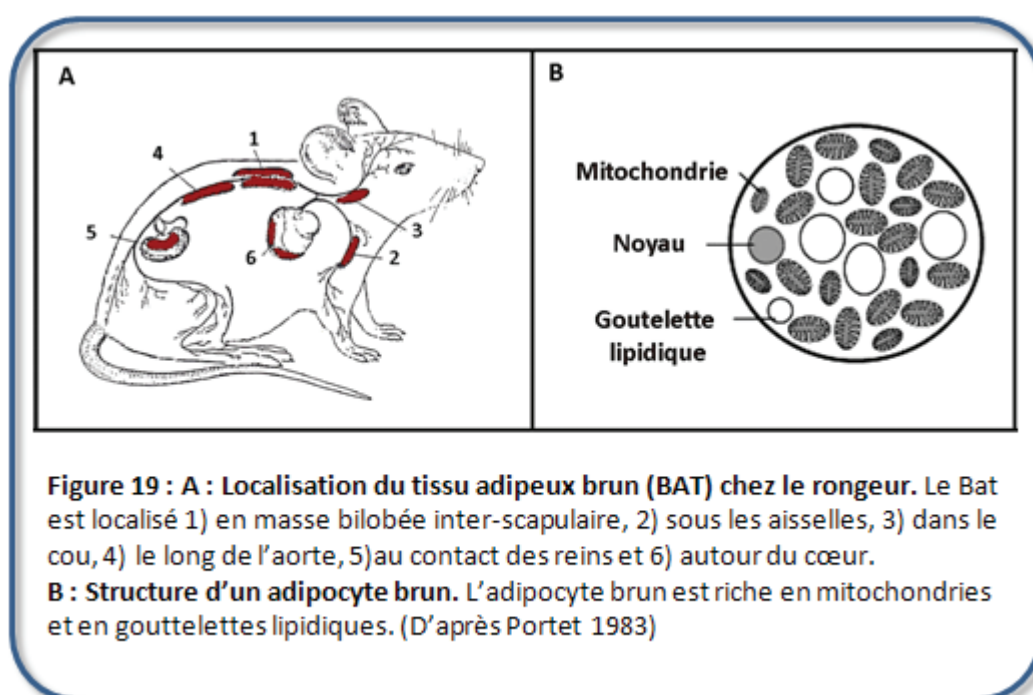
contractions involontaires et asynchrones des fibres musculaires de muscles antagonistes sans travail mécanique associé ; la majorité de l'énergie convertie est libérée sous forme de chaleur(IUPS Thermal Commission 2001 ; Stoner 1971 ; Beaudry & McClelland 2010).



Le frisson est variable dans son intensité et son efficacité thermogène, il est consommateur d'énergie et préjudiciable pour la locomotion sur le long terme. Lorsque l'exposition au froid se prolonge, la thermogénèse sans frisson se met en place (Cannon & Nedergaard 2004).

#### IV.2.2- Thermogenèse sans frisson (NST)

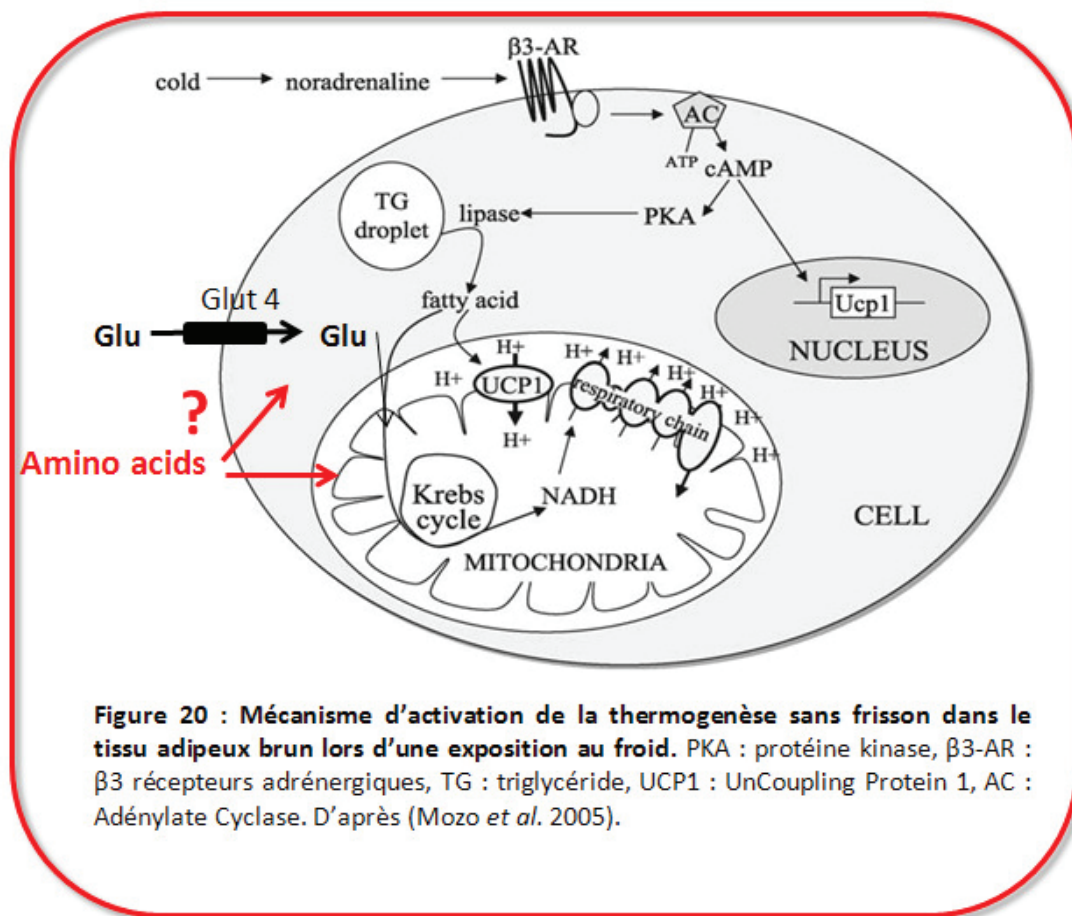
Après plusieurs jours d'exposition au froid, la NST est le principal mécanisme thermogène utilisé pour lutter contre les pertes thermiques de l'animal. Ce mécanisme est caractérisé, chez les rongeurs, par l'activation du tissu adipeux brun (BAT) (Fig.18). Localisé principalement dans la région inter-scapulaire, entourant la colonne vertébrale (Fig. 19), le BAT est très richement vascularisé et fortement innervé par le système nerveux orthosympathique. Il est constitué d'adipocytes bruns riches en mitochondries et en gouttelettes lipidiques (Fig. 19) (Smith & Horwitz 1969).



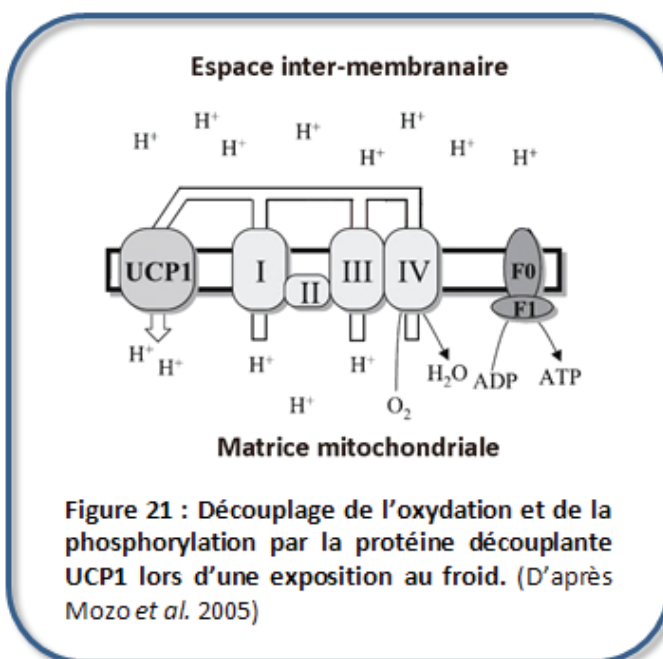
En réponse à une exposition prolongée au froid, le système nerveux sympathique libère de la noradrénaline qui se fixe sur les récepteurs adrénergiques membranaires de type  $\beta_3$  présents à la surface des adipocytes bruns (Fig. 20). Cette interaction ligand-récepteur active l'adénylate cyclase qui, *via* une protéine G, catalyse l'hydrolyse de l'ATP en AMPc. L'AMPc a deux rôles importants dans l'adipocyte brun. En premier lieu, il active des facteurs de transcription nucléaires pour permettre une expression accrue d'*Ucp1*. Cette augmentation de l'expression d'*Ucp1* est rapide et se produit en moins de 15 minutes (Bouillaud *et al.* 1984). Le second rôle de l'AMPc est de stimuler la lipolyse des gouttelettes de triglycérides contenues dans l'adipocyte. Cette augmentation de la lipolyse libère des acides gras qui sont oxydés au cours de la  $\beta$ -oxydation et le cycle de Krebs pour fournir des coenzymes réduits (NADH, FADH<sub>2</sub>) à la



chaîne respiratoire mitochondriale (Himms-Hagen 1985 ; Cannon & Nedergaard 2004 ; Mozo *et al.* 2005).



Suite à l'activation du BAT, la protéine mitochondriale UCP1, enchâssée dans la membrane



interne pourrait agir comme un pore intramembranaire. Cette protéine permet la fuite des protons vers la matrice intra mitochondriale sans phosphorylation de l'ADP (adénosine diphosphate) en ATP (adénosine triphosphate) par l'ATP-synthétase. Pour tenter de maintenir un gradient de concentration de protons constant, l'activité de la chaîne respiratoire est très fortement augmentée. Les protons entrent alors dans un cycle futile qui aboutit à une augmentation de la

production de chaleur. On parle de découplage des oxydations phosphorylantes dont la

principale conséquence est de dissiper l'énergie des oxydations sous forme de chaleur au lieu de la récupérer sous forme d'ATP (Fig. 21) (Himms-Hagen 1985 ; Cannon & Nedergaard 2004 ; Cannon & Nedergaard 2011).

### **IV.3- Conséquences de l'exposition au froid**

L'ensemble de ces processus thermogènes est consommateur d'énergie et nécessite une grande quantité de substrats énergétiques. Pour alimenter en substrats une thermogenèse de régulation élevée, les stocks énergétiques de l'organisme seront mobilisés, la synthèse des substrats énergétiques sera activée et la prise alimentaire sera augmentée en liaison avec une modification de l'homéostasie hormonale.

#### **IV.3.1- Augmentation de la prise alimentaire**

Il est couramment admis qu'au cours d'une exposition au froid, un organisme modifie son comportement alimentaire en développant une hyperphagie orientée principalement vers une alimentation de type lipidique. Ce changement de comportement alimentaire a pour but d'assurer un apport suffisant en substrats énergétiques nécessaires au maintien de l'homéostasie thermique.

Les études du comportement alimentaire de rongeurs exposés à des températures ambiantes de 9°C à 4°C révèlent que ces animaux doublent leur prise alimentaire par comparaison avec des animaux témoins maintenus à thermoneutralité (Klain *et al.* 1963 ; Anderson *et al.* 1969 ; Bing *et al.* 1998 ; Bauwens *et al.* 2011). Cette augmentation de l'ingéré ne s'accompagne pas d'une augmentation de la masse corporelle des animaux puisque l'excédent alimentaire sera principalement oxydé par les processus thermogènes. Comme l'aliment proposé aux animaux exposés au froid est identique à celui donné aux animaux témoins, le doublement de la consommation d'aliment au froid conduit à doubler l'apport protéique. Cette augmentation de la quantité de protéines ingérées induit une perturbation de l'homéostasie azotée que l'animal va devoir gérer.



### IV.3.2 - Modification du métabolisme

Les organismes vivants doivent adapter en permanence leur métabolisme à l'apport nutritionnel car la quantité et la qualité des nutriments ne permettent pas toujours de répondre aux besoins énergétiques. Le métabolisme des glucides, des lipides et des acides aminés est augmenté au cours de l'exposition au froid pour permettre un apport accru de cofacteurs réduits à la chaîne mitochondriale dans le but d'augmenter son activité et la production de chaleur. Il faut rappeler que les glucides et les lipides ne suivent pas les mêmes voies métaboliques : la glycolyse pour les glucides et la  $\beta$ -oxydation pour les lipides. Ces deux voies n'impliquent pas tout à fait les mêmes cofacteurs dans les réactions d'oxydo-réduction : principalement le NADH pour les réactions à partir des glucides et le NADH et le FADH<sub>2</sub> pour la  $\beta$ -oxydation des lipides.

#### IV.3.2.1 - Métabolisme glucidique

Le foie est l'organe qui intervient principalement dans l'homéostasie glucidique, il peut alternativement libérer du glucose dans la circulation sanguine ou en prélever et le stocker. Cette balance entre utilisation et synthèse du glucose est contrôlée par une multitude de facteurs dont l'environnement nutritionnel et hormonal de l'organisme et les concentrations en substrats des différentes voies métaboliques (Hue 2001). Ainsi, lorsque la nourriture est en excès, le foie stocke le glucose sous forme de glycogène et peut également le convertir en acides gras par la voie de la lipogenèse *de novo* (Hellerstein *et al.* 1996). Inversement, en période de jeûne, le foie peut produire du glucose pour maintenir la glycémie et approvisionner les tissus extra-hépatiques. Ce glucose peut provenir de deux sources différentes : du glycogène à la suite de sa dégradation par la glycogénolyse et de certains précurseurs non glucidiques qui participent à la synthèse *de novo* de glucose par la voie de la néoglucogenèse. Le foie, le rein et sans doute l'intestin sont les seuls tissus qui possèdent l'équipement enzymatique indispensable à cette néoglucogenèse (Croset *et al.* 2001). La contribution relative de la néoglucogenèse à la production hépatique de glucose est très variable et dépend de la situation physiologique de l'individu. Des données sont cependant disponibles en ce qui concerne la contribution relative de la néoglucogenèse intestinale chez le rat à jeun depuis 72 heures. Elles montrent que cette néoglucogenèse peut fournir plus de 40% de la totalité du glucose circulant (Mithieux 2001). Il faut préciser aussi qu'à l'inverse de la glycolyse qui permet de générer 2 à 3 molécules d'ATP, la néoglucogenèse est un processus consommateur d'énergie, puisque pas

moins de 6 molécules d'ATP sont nécessaires à la synthèse d'une seule molécule de glucose à partir d'hydrate de carbone comme le pyruvate ou le lactate.

Lors d'une exposition au froid, de nombreux travaux montrent que le métabolisme glucidique est modifié dans le but d'augmenter la disponibilité du glucose pour l'organisme. Par exemple, l'utilisation du glucose par le tissu adipeux brun est augmentée de 21 fois chez des rats soumis à une exposition au froid par rapport à celle des animaux contrôles (22°C). La quantité de GLUT4, le transporteur membranaire du glucose passe de 75 à 436 pmol/g d'extraits membranaires de tissu adipeux brun chez des rats exposés 10 jours à 4°C (Greco-Perotto *et al.* 1987) et cette augmentation est corrélée avec une utilisation du glucose multipliée par un facteur 4,5 (Greco-Perotto *et al.* 1987 ; Nikami *et al.* 1992).

*In vitro*, sur du foie isolé et perfusé de rat soumis à un stress thermique froid, la consommation d'oxygène et la production de glucose sont augmentées légèrement après les 5 premiers jours d'exposition au froid et retrouvent le niveau basal des animaux témoins après 20 jours d'exposition continue au froid. La production de glucose à partir de lactate, de pyruvate et de glycérol est augmentée de 20-30% au bout de 5 jours d'exposition au froid ce qui traduit la stimulation de la néoglucogenèse (Shiota *et al.* 1985). Ces mêmes auteurs précisent d'ailleurs que la néoglucogenèse présente une efficacité maximale le 5<sup>ème</sup> jour de l'exposition au froid. En revanche, la stimulation de la néoglucogenèse par le glucagon n'est effective qu'à partir du 20<sup>ème</sup> jour d'exposition au froid (Shiota *et al.* 1995).

*In vivo*, Nakagawa et Nagai (1971) ont montré qu'une courte exposition au froid (5°C) de rats mâles Wistar entraîne, 3 heures après le début de l'exposition, une augmentation significative de l'activité enzymatique de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) dans le foie, une enzyme clé de la néoglucogenèse. Au contraire, l'activité des enzymes glycolytiques comme la pyruvate kinase, lipogéniques comme l'enzyme malique et la glucose-6-phosphate déshydrogénase diminue mais seulement 72 heures après le début de l'exposition au froid.

Ces résultats montrent l'intrication des voies métaboliques de la glycolyse et de la néoglucogenèse pour maintenir un taux de glucose suffisamment élevé pour répondre à la contrainte énergétique. D'ailleurs l'activation des enzymes néoglucogéniques se produit également dans le muscle squelettique suggérant que la néoglucogenèse musculaire pourrait fournir le « carburant » nécessaire à l'activité de frisson, en réponse au froid (Nakagawa & Nagai 1971).

### VI.3.2.2 - Métabolisme lipidique

Lors de la thermogénèse de frisson, la concentration sanguine et tissulaire en acides gras non estérifiés est augmentée en liaison avec une forte stimulation de la lipolyse du tissu adipeux blanc grâce à l'activation de la lipase hormonosensible (Himms-Hagen 1972). Dès le premier jour d'exposition au froid, le taux de lipolyse dans le WAT est ainsi doublé (Uchida 1979). Les acides gras fournis constituent des substrats privilégiés des processus thermogènes notamment dans le BAT (Cannon et Nedergaard, 2004). Une activation de la lipolyse est également détectée dans les adipocytes bruns, avec un triplement de la libération des acides gras non estérifiés et du glycérol *in vitro* par les adipocytes provenant d'animaux exposés 15 jours à 4°C comparativement aux cellules provenant d'animaux à thermoneutralité (Rabi *et al.* 1977). Cette activation de la lipolyse du BAT interviendrait plus tardivement (Uchida 1979).

### VI.3.2.3 - Métabolisme protéique

A notre connaissance peu d'études se sont intéressées à l'effet d'une exposition au froid sur le métabolisme des acides aminés. Pourtant, des études anciennes avaient déjà mis en évidence que l'excrétion azotée était fortement accrue chez des rats exposés au froid avec une augmentation de l'excrétion d'urée, de créatine, de créatinine et d'acide urique (Mefferd *et al.*, 1958 ; Klein et Vaughan, 1963). Plus récemment, l'équipe de López-Soriano a étudié les conséquences d'une exposition au froid sur le métabolisme des acides aminés dans le foie, le WAT et le BAT de rats mâles Wistar. Une exposition des animaux pendant 12 heures à 4°C provoque une augmentation du contenu protéique du WAT sans variation de son contenu en eau ou en lipides. Cette modification est accompagnée d'une diminution de l'activité de la glutamate déshydrogénase et de l'alanine transaminase. A l'inverse, l'activité de la glutamine synthétase et de l'aspartate transaminase est presque doublée (López-Soriano & Alemany 1986). Dans le BAT, une exposition chronique (15 jours) à 4°C modifie l'homéostasie intra-tissulaire des acides aminés mais de manière très différente comparée à celle du WAT. Ainsi, la concentration en glutamate est doublée, celles de la glutamine, de l'arginine, de la citrulline et de l'ornithine sont diminuées de moitié. La concentration en proline n'est pas modifiée. Sur le plan enzymatique, à l'inverse de ce qui se passe dans le WAT, une augmentation de l'activité de la glutamate déshydrogénase et de l'alanine transaminase est observée, alors que l'activité enzymatique de la glutamine synthétase est diminuée (López-Soriano & Alemany 1987).

L'activité de ces mêmes enzymes augmente dans le foie des animaux exposés 4°C pour être doublée au bout de 15 jours (López-Soriano & Alemany 1988).

Il est intéressant de noter que l'OAT est située au carrefour des différentes voies enzymatiques modifiées dans le WAT, le BAT et le foie lors de l'exposition au froid. Curieusement cette enzyme n'a jamais été étudiée. Pourtant, comme nous l'avons déjà précisé, l'OAT est une enzyme qui permet de synthétiser des acides aminés glucoformateurs à partir de l'ornithine.

#### **IV.3.3 - Modification de l'homéostasie hormonale**

Au cours d'une exposition au froid, la sécrétion de nombreuses hormones est modifiée. La mise en place de cette nouvelle homéostasie hormonale a pour but d'activer le métabolisme de l'individu et de faciliter sa survie. La plupart des études ont été réalisées chez le rat.

C'est ainsi qu'une forte libération d'adrénaline et de noradrénaline est décrite chez les rats mâles soumis à une exposition au froid à 4°C (Bibbiani & Viola-Magni 1971). Dans les mêmes conditions expérimentales, d'autres auteurs rapportent une augmentation conséquente (x3) de la concentration plasmatique en noradrénaline (Benedict *et al.* 1979). Une des conséquences directes de cette augmentation est l'accroissement de 60% de la concentration sérique d'hormones thyroïdiennes T3 et T4 qui va se maintenir tout du long des 25 jours d'exposition au stress thermique chez des rats mâles Wistar (Goglia *et al.* 1983). Cette augmentation de la sécrétion des hormones thyroïdiennes passe par une régulation hypothalamo-hypophysaire. En réponse aux signaux noradrénergiques induits par l'exposition au froid, une augmentation de la synthèse et de la libération de TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) par l'hypothalamus se produit très rapidement. Il en résulte une augmentation de la libération de TSH (Thyroid Stimulating Hormone) hypophysaire qui va directement stimuler la sécrétion d'hormones par la thyroïde. Il a été estimé que la réponse hypophysaire a lieu en moins de 30 minutes après une exposition à 4°C chez le rat (Leppäluoto *et al.* 2005).

L'exposition au froid déclenche également une augmentation rapide, en moins d'une heure, de la sécrétion de glucagon, hormone hyperglycémiante dont on connaît le rôle dans le métabolisme des lipides et la néoglucogenèse. Les concentrations plasmatiques restent élevées pendant les deux premières semaines d'exposition au froid (Kuroshima & Doi 1976 ; Kuroshima *et al.* 1978 ; Seitz *et al.* 1981). A l'inverse, la concentration plasmatique d'insuline n'est pas modifiée au cours d'une exposition à un stress thermique (Seitz *et al.* 1981). Enfin, la

concentration plasmatique en testostérone de rats mâles exposés à un stress thermique de 4°C est diminuée de 50% à 90% selon les études (Gomez & Dallman 2001 ; Andersen *et al.* 2004).

Les modifications de l'homéostasie hormonale ont été très peu étudiées chez la souris exposée à un stress thermique. Une étude montre cependant une diminution de la sécrétion de testostérone et une augmentation de la sécrétion des glucocorticoïdes chez des souris BALB/Clac et C57B5/6J exposées 5 semaines à 6°C (Moshkin *et al.* 1993).

*Aux termes de cette introduction bibliographique, l'OAT apparait comme une enzyme importante, au centre du carrefour métabolique entre arginine et glutamine, deux précurseurs importants des différentes voies métaboliques qui assurent l'homéostasie azotée. L'OAT est soumise à des mécanismes de régulation très complexes et l'orientation de la réaction qu'elle catalyse varie en fonction de l'organe considéré, de l'abondance des substrats et de l'activité des autres enzymes métaboliquement liées. Sa régulation par les hormones et les apports protéiques font de l'OAT un acteur potentiel de la gestion des flux inter-organes d'acides aminés qui pourrait être impliqué dans des situations de contraintes métaboliques. La bibliographie sur le sujet reste très fragmentaire surtout chez la souris, il semble pourtant d'un grand intérêt d'aller explorer les spécificités métaboliques de cette enzyme dans des conditions physiologiques particulières.*

# OBJECTIFS de nos travaux

L'objectif général de notre étude a été d'étudier l'implication potentielle de l'OAT dans des situations de contraintes métaboliques fortes pour l'organisme. Notre revue bibliographique montre que l'expression de l'OAT a été bien étudiée dans le foie, le rein et l'intestin chez l'homme et le rat et que les rares travaux consacrés à la souris mettent en évidence de grosses différences avec le rat au niveau de la régulation de cette enzyme, empêchant toute transposition rat/souris et soulignant le besoin d'investigations chez la souris, un animal de référence en génétique. Nous avons donc choisi la souris comme modèle d'étude et nos travaux s'articulent autour de trois grands axes :

## **1/ Caractérisation de l'OAT chez la souris**

Devant le manque d'informations disponibles chez la souris, nous avons d'abord mesuré les paramètres cinétiques de l'OAT, recherché son expression et mesuré son activité dans divers organes, chez le mâle et chez la femelle.

## **2/ Variation de l'activité OAT au cours du développement postnatal jusqu'à la puberté.**

Nous nous sommes intéressés à la régulation de l'OAT au cours de la croissance postnatale des souriceaux mâles et femelles. Cette période est caractérisée, en particulier chez l'animal « altricial », par un fort taux de croissance donc un besoin important d'acides aminés pour assurer une synthèse accrue de protéines. Nous nous sommes posé deux questions : dans ces conditions, des variations d'activité OAT interviennent-elles pour maintenir l'homéostasie azotée au moment du sevrage qui induit un changement majeur dans l'apport protéique ? Quelle est l'influence des hormones sexuelles sur l'activité OAT au moment de la puberté ?

## **3/ Réponses de l'activité OAT à une exposition aigüe et chronique au froid chez les souris adultes mâles**

Nous nous sommes ensuite intéressés aux modifications de l'expression de l'OAT en réponse à une exposition au froid, contrainte énergétique qui entraîne une modification de l'homéostasie hormonale. Les souris réagissent en augmentent fortement leur prise alimentaire et donc leur apport azoté. Dans ce cas-là, peut-on observer des variations d'activité OAT pour réguler cet excès d'apport azoté ? Nous avons vu que le catabolisme de l'ornithine est à l'origine de nombreux acides aminés (proline, glutamate, glutamine...) dits glucoformateurs, la dégradation

de leur squelette carboné libérant l'un des composés suivants :  $\alpha$ -cétooglutarate, oxaloacétate, fumarate, succinyl-CoA et pyruvate qui entrent dans le métabolisme intermédiaire pour la production de l'énergie et la néoglucogenèse hépatique et rénale. Cette néoglucogenèse interviendrait pour une part notable dans l'approvisionnement de l'organisme en glucose. Des variations d'activité OAT peuvent-elles contribuer à cette orientation métabolique ? Nous avons ciblé notre étude sur les tissus qui sont potentiellement des sites de néoglucogenèse et/ou qui participent aux capacités thermogènes de l'animal (foie, rein, muscle squelettique, BAT, WAT).

**MATERIELS ET**

**METHODES**





Nous ne détaillons ici que les protocoles qui sont communs aux trois études. Les protocoles expérimentaux spécifiques notamment en ce qui concerne les animaux sont précisés au début de chaque étude.

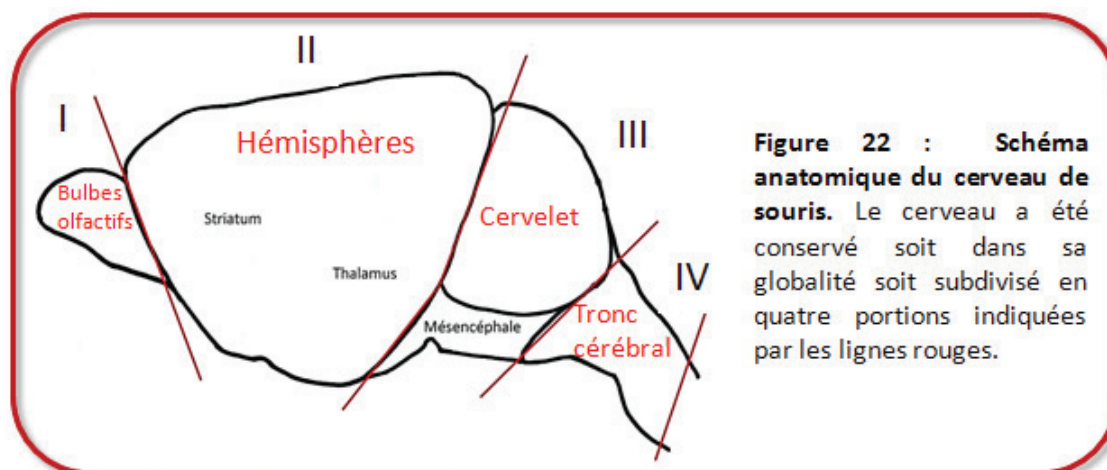
## I - Anesthésie et prélèvement des organes

### I.1 - Anesthésie des animaux

Les souris ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale de 0,1 mL de pentobarbital sodique / 30 g de MC (Nembutal 6%, Céva Santé Animale, Libourne, France) dilué au demi dans du NaCl 0,9% pour les animaux adultes et dilué au quart dans du NaCl 0,9% pour les souriceaux. Pour respecter les rythmes biologiques, toutes les souris ont été anesthésiées et prélevées entre 8h00 et 10h00. Les animaux ont été soigneusement manipulés pour limiter le stress. La réponse à un stimulus douloureux sur la patte ou la queue (pincement) a été utilisée pour s'assurer de l'efficacité de l'anesthésie.

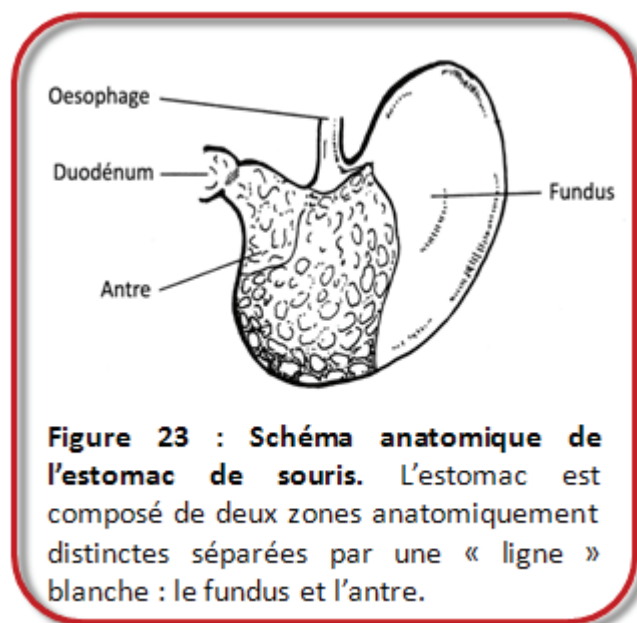
### I.2 - Prélèvement des tissus et organes

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une loupe binoculaire stéréoscopique (Stemi SV6, Zeiss, Le Pecq, France) dont l'éclairage est assuré par une source de lumière froide (Schott KL750, France). Après avoir effectué une laparotomie, le sang a été directement prélevé dans l'aorte et recueilli dans des tubes héparinés. Les organes suivants ont été rapidement prélevés: le foie, les reins, les glandes surrénales, le tissu adipeux blanc, l'estomac, la rate, les testicules, les glandes de Tyson, les ovaires, l'utérus, le cœur, les poumons, le thymus, les glandes sous-maxillaires, le tissu adipeux brun, le cerveau, les quadriceps, les gastrocnémiens et les fémurs. Compte tenu de la complexité anatomique du cerveau et de l'estomac, nous avons décidé de les subdiviser.



**Figure 22 : Schéma anatomique du cerveau de souris.** Le cerveau a été conservé soit dans sa globalité soit subdivisé en quatre portions indiquées par les lignes rouges.

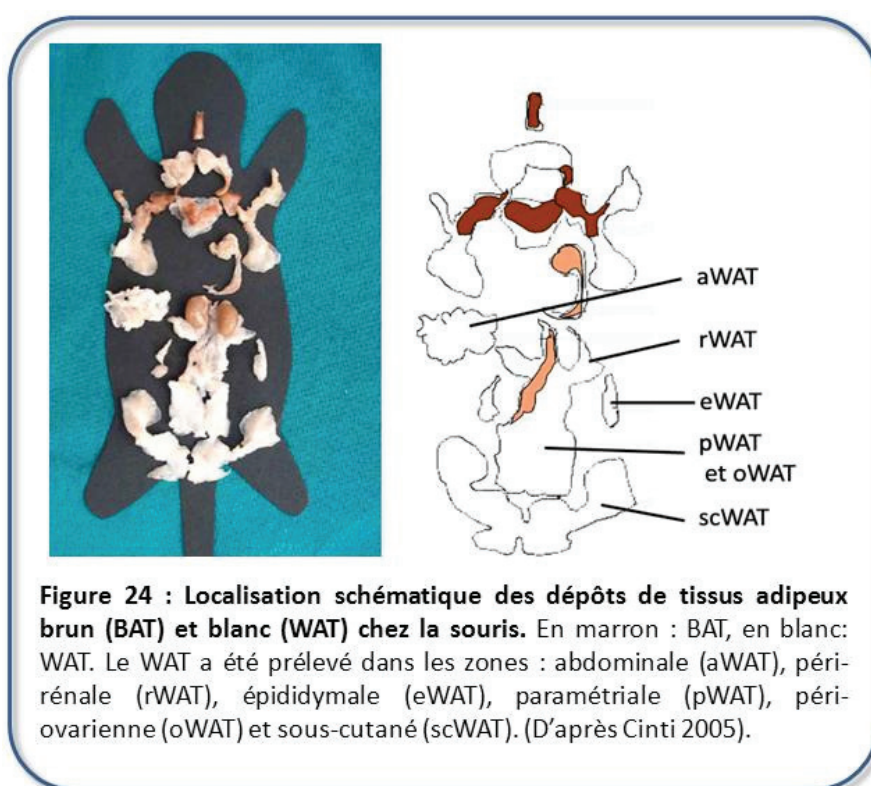
Le cerveau a été soit conservé dans sa globalité soit subdivisé en quatre portions. La première portion est constituée des lobes olfactifs, la deuxième, des hémisphères cérébraux, du thalamus, de l'hippocampe et du septum. La troisième portion est composée du cervelet et du mésencéphale, et la quatrième portion ne comporte que le tronc cérébral. Dans un souci de simplification, nous parlerons d'« hémisphères » et de « cervelet » pour les deuxième et troisième portions (Fig. 22).



troisième portions (Fig. 22).

L'estomac a été prélevé et immergé immédiatement dans une solution de NaCl 0,9% maintenue dans la glace fondante (4°C) jusqu'à la fin de la dissection de la souris. Ensuite, le fundus et l'antre ont été disséqués, les restes de nourriture ont été éliminés et les deux portions de l'estomac ont été soigneusement rincées avec du NaCl 0,9% (Fig. 23).

Etant donné la vaste répartition des tissus adipeux dans l'organisme, il est indispensable de préciser les sites de dépôts qui ont été prélevés (Fig. 24). Le tissu adipeux brun (BAT) a été collecté dans les régions inter-scapulaire (iBAT) et sous-scapulaire (sscBAT) ainsi que le long de la colonne vertébrale (cBAT). Plusieurs dépôts de tissu



adipeux blanc (WAT) ont été prélevés et regroupés : le WAT épидидymal (eWAT), le WAT péri-ovarien (oWAT), le WAT abdominal (aWAT), le WAT péri-rénal (rWAT), le WAT paramétrial (pWAT) ainsi que le WAT sous-cutané (scWAT) (Figure 24).

Les organes entiers ou chacune des portions d'organe disséqués ont été immédiatement congelés soit dans de l'azote liquide soit sur une plaque métallique refroidie par de la carboglace et ont été conservés à -80°C.

## **II - Analyse des transcrits codant pour l'OAT**

### **II.1 - Extraction et dosage des ARN totaux**

Les ARN totaux ont été extraits à partir d'organes entiers congelés ou d'échantillons d'environ 100 mg de foie, de quadriceps, de gastrocnémien, de poumon et de WAT congelés. Pour augmenter l'efficacité de l'extraction des ARN, les organes et les échantillons ont été finement coupés sur une plaque métallique, préalablement refroidie à -80°C, à l'aide d'une lame de scalpel (Swann-Morton, Peynier, France). Les morceaux d'organes ont été immédiatement plongés dans un tube Eppendorf qui contenait 700 µL de Trizol (Invitrogen, France) et maintenu dans la glace fondante. Les tissus ont été broyés à température ambiante à l'aide d'un broyeur à billes (TissueLyser LT, Qiagen) pendant 1 minute à 50 Hz. Toutes les étapes suivantes ont été réalisées à 4°C. Les ARN totaux ont été solubilisés dans la phase aqueuse en ajoutant à l'homogénat 200 µL de chloroforme à 99%. Ce mélange a été agité au vortex ( $\approx$  1000 tours/min) puis centrifugé 15 minutes à 12.000 g. La phase aqueuse a été prélevée puis les ARN totaux ont été précipités à froid en ajoutant 500 µL d'isopropanol puis en congelant les échantillons 1 heure à -80°C. Le culot d'ARN est obtenu après une étape de centrifugation de 15 minutes à 12.000 g. Ces culots sont rincés en ajoutant 700 µL d'éthanol à 70%, agités à l'aide d'un vortex puis centrifugés 5 minutes à 7.500 g. Les culots d'ARN totaux ont été rincés une seconde fois avec de l'éthanol 70%, puis séchés sous une lampe et remis en suspension dans un volume de 30 à 150 µL d'eau pure stérile en fonction de la taille du culot d'ARN obtenu. La concentration et la pureté des ARN ont été mesurées à l'aide d'un nanodrop (Thermoscientific). Une solution fille à 1 µg/µL a été réalisée pour chaque échantillon.

## II.2 - Transcription inverse des ARN messagers (ARNm)

Cette étape consiste à synthétiser des ADNc à partir d'une population d'ARNm. Pour étudier l'expression de l'OAT par PCR semi-quantitative, un échantillon d'1 µg d'ARN totaux a été ajouté à une solution composée de 1 µg de dNTP (10 mM), de 1 µg de polyT (10 mM) et de 10 µL d'eau pure, puis l'ensemble a été chauffé 5 min à 65°C dans un thermocycleur Thermo Hybaid (Ashford,UK). Cette étape déstabilise les structures secondaires, linéarise les ARN totaux et fixe les polyT par complémentarité de séquence sur la queue polyA des ARNm. Une fois fixés, les polyT serviront d'amorces et en s'hybridant sur les ARNm permettront l'élongation du brin d'ADNc sous l'action de la transcriptase inverse MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, MMLV-RT). Pour initier cette réaction, un mélange constitué de 200 U de MMLV-RT, de 4 µL de tampon MMLV-RT 10X, de 2 µL de DTT (0,1M) et de 1 µL de RNase Inhibitor a été distribué dans chaque échantillon. Les échantillons ont alors été incubés 60 min à 37°C dans le thermocycleur pour permettre la transcription inverse puis 15 min à 70°C pour arrêter la réaction en dénaturant l'enzyme.

Une RT plus spécifique a été nécessaire pour l'analyse de certains de nos échantillons par PCR quantitative (qPCR). Nous avons alors utilisé le kit High Capacity RNA to cDNA Kit de Applied Biosystems. Ce kit utilise également l'enzyme MMLV comme transcriptase inverse. Un mélange de 2 µg d'ARN totaux (1µg/µL), de 7 µL d'eau RNase free, de 10 µL de tampon de RT 2X et de 1 µL de RT Enzyme Mix 20X a été placé 60 minutes à 37°C puis 5 minutes à 95 °C dans un thermocycleur (Thermo Hybaid, Ashford, UK).

## II.3 – Amorces

Pour la PCR semi-quantitative, les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel « Primer3 » (<http://frodo.wi.mit.edu/>) sur la séquence de l'ARNm de l'OAT de *Mus musculus* (NM\_016978.2). Après vérification de leur spécificité, les séquences sens (5'-TCCAGGATACCTGACAGGAGTT-3') et anti-sens (5'-ATCTTGTCTGCATTCTCAGCAA-3') ont été retenues. La taille de l'amplicon attendu est de 330 paires de bases (pb).

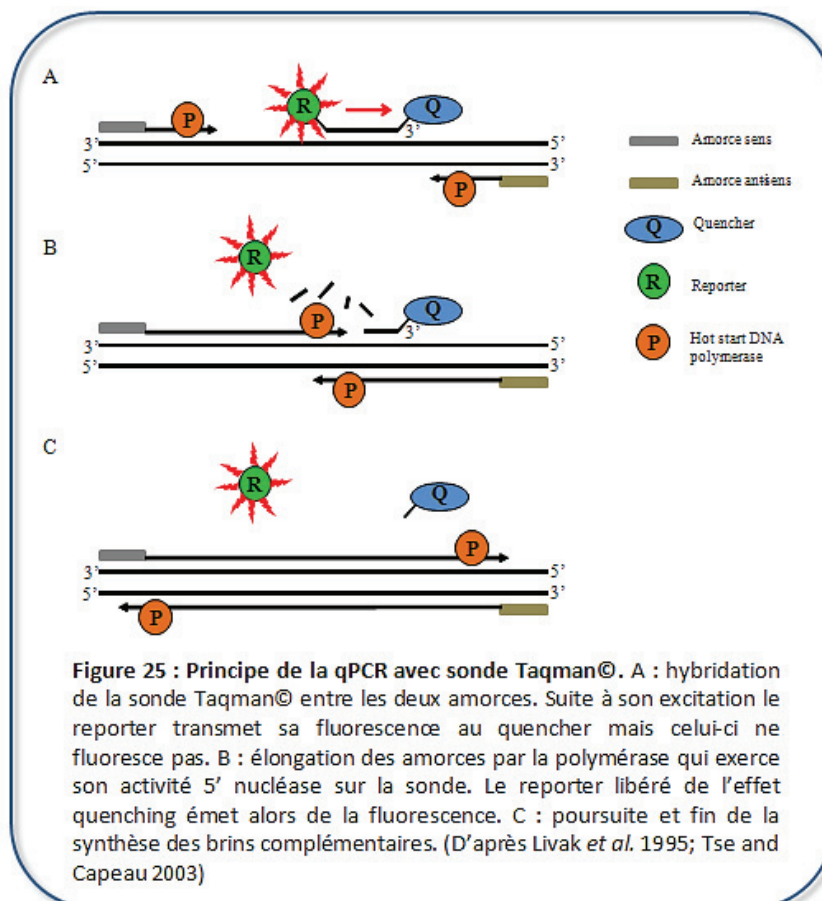
Pour la qPCR avec sondes Taqman®, les sondes et les amorces spécifiques de l'OAT ont été choisies dans le catalogue proposé par Life Technologie.

## II.4 – Polymérisation des ADNc

L'amplification des ADNc par PCR a été réalisée à partir de 2 µL du produit de RT mélangés à 2,5 µL de PCR Buffer 10X, 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL d'amorce sens (15 µM), 0,5 µL d'amorce anti-sens (15 µM), 1 U de Taq DNA polymerase platinum (5 U/µL) et 19 µL d'eau pure stérile. L'enzyme a été activée en chauffant cette solution pendant 2 minutes à 94°C. Chaque échantillon a été soumis à 28 cycles de PCR qui se compose chacun d'une phase de dénaturation (45 secondes à 94°C), d'une phase d'hybridation (30 secondes à 55°C) et d'une phase d'élongation (1 min à 72°C). Une phase d'élongation supplémentaire de 5 min à 72°C termine le programme PCR. L'analyse des produits de PCR a été réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose 2% qui contient 0,01% de bromure d'éthidium. Après une migration pendant 30 minutes à 60 V (Thermo Hybaid), les bandes d'ADNc ont été visualisées sous ultraviolet et les gels ont été photographiés à l'aide d'un système d'analyse d'image Kodak Digital Science™ caméra DC120.

## II.5 - PCR quantitative avec sonde Taqman®

### II.5.1 - Principe



La qPCR avec sonde Taqman® repose sur l'utilisation de fragments oligonucléotidiques marqués en leurs extrémités 5' et 3' et sur le principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) ainsi que le principe du *quenching*.

La sonde Taqman® utilisée en qPCR, porte en son extrémité 5' un fluorophore donneur qui est un dérivé de la fluorescéine, et en 3' un quencher qui est une molécule

dérivée de la rhodamine. En raison de la faible distance séparant ces deux molécules, lorsque le fluorophore est excité, l'énergie qu'il a absorbée est transmise par FRET au quencher. Le quencher se retrouve ainsi dans un état excité, puis retourne à son état initial en dissipant l'énergie accumulée sous forme de chaleur. Par le phénomène de *quenching* la fluorescence de la sonde s'éteint. Au cours du processus d'amplification, le système Taqman® utilise l'activité exonucléase en 5' de l'ADN polymérase pour hydrolyser la sonde Taqman® (Holland *et al.* 1991). Le clivage de la sonde éloigne les deux molécules et libère le fluorophore de l'effet *quenching*, ce qui restaure sa fluorescence. Ainsi, l'intensité de la fluorescence émise par les fluorophores libérés est mesurée à chaque fin de cycle d'amplification et est proportionnelle au nombre de brins d'ADNc amplifiés (Fig. 25).

### II.5.2 - PCR avec sonde Taqman®

Les ADNc issus de la réaction de RT ont été dilués au 1/20 avec de l'eau RNase free (Applied Biosystems) et 2 µL de cette dilution ont été utilisés pour réaliser l'amplification par qPCR. Ces 2 µL d'ADNc dilués sont mélangés à 5 µL de « Taqman® Fast Advanced Master Mix » (Applied Biosystems) qui contient l'ADN polymérase « Hot start », 0,5 µL de « Taqman® Gene Expression Master Mix » (Applied Biosystems) qui contient les amorces et la sonde Taqman®, et 2,5 µL d'eau RNase free. Le mélange obtenu est déposé dans les puits d'une plaque 96 puits (Fast 96 Well Reaction Plate, Applied Biosystems), et chaque échantillon a été déposé en double. La plaque a été celée avec un film optique (Micro Amp Optical Adhesive Film Kit, Applied Biosystems), puis a été centrifugée 30 secondes à 800 *g* afin d'éviter toute bulle d'air qui pourrait altérer la mesure de la fluorescence. Les conditions de temps, températures et le nombre de cycles sont données dans le tableau 2.

La qPCR a été réalisée dans un thermocycler Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System et les données ont été recueillies et analysées à l'aide du logiciel StepOne™ Software v.2.2.2.



Temps et températures			
Etape initiale		Chacun des 40 cycles	
		Cycle	
Initiation	Initiation	Dénaturation	Hybridation/ élongation
2 min 50°C	20 sec 95°C	1 sec 95°C	20 sec 60°C

**Tableau 2 : Paramètres (temps, températures) utilisés en PCR quantitative avec sonde Taqman®.**

### III - Dosage de l'activité OAT

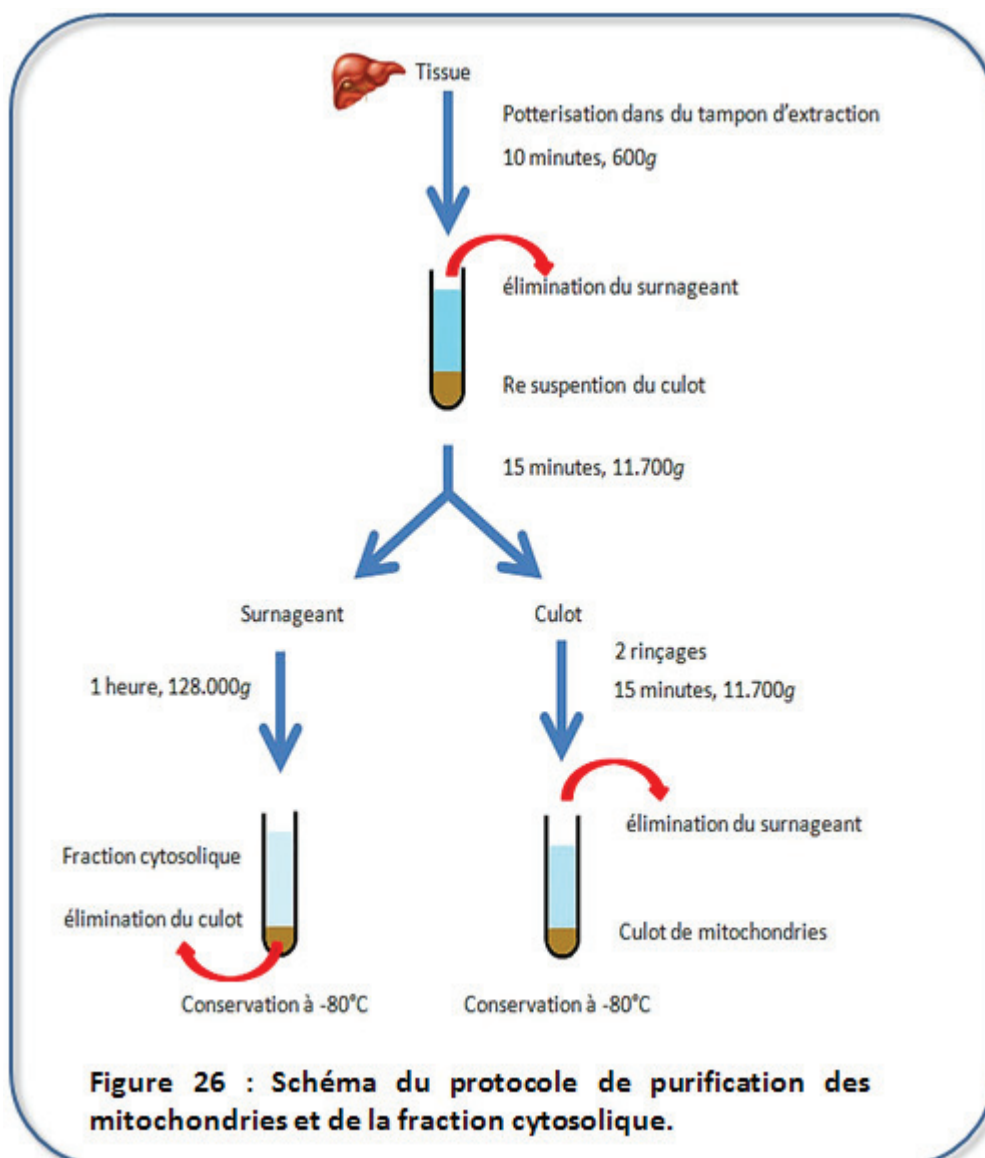
#### III.1 - Préparation des échantillons

Les organes congelés ont été plongés dans un tampon d'extraction (0.33 M sucrose, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5% Triton X-100) dans les proportions de 1 mL de tampon / 100 mg d'organe (1/10, v/w) puis broyés (Ultra-turrax T25, VWR, France) à la vitesse maximale de 24.000 tours/minute. A la suite d'une étude pilote, nous avons modifié l'extraction de l'OAT du cerveau, des hémisphères, du cervelet et du tronc cérébral en n'ajoutant qu'1 mL de tampon d'extraction / 200 mg d'organe (1/5, v/w). Tous les homogénats ont subi 3 cycles de congélation (-80°C) / décongélation à température ambiante pour éclater les mitochondries et libérer l'OAT. A la fin du second cycle de congélation/décongélation, les homogénats ont été broyés une seconde fois à l'aide de l'ultra-turrax (24 000 tours/minute). Les homogénats ont été centrifugés 15 minutes à 21.000 g à 4°C pour éliminer les débris membranaires et les protéines insolubles. Les surnageants ont été prélevés et stockés à -80°C.

#### III.2 - Purification des mitochondries et de la fraction cytosolique

Les mitochondries et la fraction cytosolique ont été purifiées par centrifugation différentielle. Après avoir anesthésié les souris, les organes ont été prélevés et plongés dans du NaCl 0.9% préalablement refroidi à 4°C dans la glace fondante. Dans la plupart des expériences, les organes de plusieurs animaux ont été regroupés pour obtenir un culot de mitochondries

suffisamment important pour doser l'activité OAT. Les mitochondries ont été extraites selon la méthode décrite par Cain et Skilleter (1987) et Levillain et collaborateurs (2005b). Toutes les étapes ont été réalisées à 4°C. Les organes ont été broyés doucement (60-80 cycles / minute) dans 4 mL de tampon d'extraction (saccharose 0,25 M, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6) à l'aide d'un potter (LSC homogenizer LH-4, Yamato) et d'un piston en téflon (Bellco Glass Inc, Vineland, NJ, USA). Le broyat a été centrifugé 10 minutes à 600 g pour éliminer les débris cellulaires et la fraction nucléaire (Fig. 26). Le surnageant (S1) a été récupéré et centrifugé 15 minutes à 11700 g. Le culot de mitochondries obtenu a été lavé 2 fois dans 2 mL de tampon d'extraction et centrifugé 15 minutes à 11700 g (Fig. 26). Les culots de mitochondries ont été congelés puis homogénéisés dans du tampon d'extraction comme décrit précédemment pour les organes. Le surnageant (S2) a été centrifugé 60 minutes à 128.000 g à l'aide d'une ultracentrifugeuse (Optima TLA 100.2 Ultracentrifuge, Beckman) pour purifier la fraction cytosolique (Fig. 26). Un échantillon de la fraction cytosolique a été congelée et conservée à -80°C.





### **III.3 - Dosage de l'activité OAT**

#### **III.3.1 - Principe**

Le dosage de l'activité OAT repose sur la méthode décrite par Peraino et Pitot (1963) puis modifiée par Strecker (1965) et Herzfeld et Knox (1968). En fonction de l'organe considéré, un aliquot de 50 à 500 µL de surnageant a été prélevé et déposé dans un tube eppendorf de 1,5 ml. Du tampon d'extraction a été ajouté pour que le volume final soit de 500 µl. Le dosage de l'activité enzymatique a été initié par l'ajout de 500 µL du tampon de réaction (75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à pH 8; 20 mM L-Ornithine; 0,45 mM de pyridoxal phosphate; 5 mM  $\alpha$ -aminobenzaldehyde; 3,75 mM  $\alpha$ -cétoglutarate). Chaque échantillon a été dosé en duplicate ou triplicate. Un contrôle de réaction a été réalisé pour chaque échantillon en omettant l' $\alpha$ -cétoglutarate dans le tampon. Les échantillons ont été incubés de 30 à 120 minutes dans un bain marie thermostaté à 37°C à l'abri de la lumière car cette réaction biochimique est photosensible. Sous l'action de l'OAT, l'ornithine est métabolisée en pyrroline-5-carboxylate (P5C) qui réagit avec l' $\alpha$ -aminobenzaldéhyde pour former un sel de dihydroquinazolinium qui est photosensible. La réaction a été stoppée par l'ajout de 100 µL d'acide trichloroacétique à 40%. Après avoir été agités à l'aide d'un vortex, les tubes sont placés dans un bac de glace. Les tubes ont été centrifugés 3 minutes à 21 000 g à 4°C. Par contre, pour le BAT, cette étape de centrifugation doit être au moins égale à 30 min pour éliminer les « fines micelles lipidiques » qui perturbent la lecture de l'absorbance au spectrophotomètre. L'absorbance a été mesurée à 440 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu UV-1800, Lyon).

#### **III.3.2 - Dosage des protéines**

La concentration des protéines solubles a été déterminée par la méthode de (Bradford 1976). La gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum bovin (0-30 µg BSA /µl). Chaque échantillon a été dosé en duplicate et l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 595 nm (UV 1800, Shimadzu). La zone de linéarité de la gamme étalon a permis de déterminer les concentrations de protéines pour chaque échantillon.

#### **III.3.3 - Calcul de l'activité OAT**

Pour déterminer la quantité de P5C produite par l'activité OAT dans chaque échantillon, nous avons utilisé la Loi de Beer-Lambert ( $\text{Abs}=\epsilon.l.[C]$ ) en utilisant le coefficient d'extinction molaire classiquement décrit dans la littérature pour le sel de dihydroquinazolinium ( $2710 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )

(Herzfeld & Knox 1968 ; Ventura *et al.* 2010). Une molécule de P5C néoformée réagit avec une molécule d' $\alpha$ -aminobenzaldéhyde pour former une molécule de sel de dihydroquinazolinium. La concentration de sel de dihydroquinazolinium correspond à la concentration de P5C formé au cours de la réaction catalysée par l'OAT et donc à la concentration d'ornithine qui a été transaminée. En tenant compte de la concentration en protéines mesurée dans l'échantillon et du temps d'incubation, l'activité OAT a été exprimée en Unité Internationale (IU) : nmol P5C/mg de protéines solubles/minute. Enfin, pour tenir compte d'une possible variation de la proportion de sang restant dans les organes prélevés, et donc de la concentration en protéines sanguines impactant la concentration en protéines tissulaires, l'activité OAT a été aussi exprimée par unité de masse fraîche d'organe (nmol P5C/mg de poids frais d'organe/minute).

### **III.4 - Détermination des paramètres cinétiques de l'OAT**

Afin de pouvoir déterminer les paramètres cinétiques de l'OAT, nous avons dû mesurer des vitesses initiales de réaction enzymatique pour différentes concentrations de substrat.

#### **III.4.1 - Mesure des vitesses initiales de réaction de l'OAT**

Dans un premier temps, nous avons déterminé la période durant laquelle la vitesse de la réaction biochimique de l'OAT est constante et ce, pour chaque concentration d'ornithine utilisée (0; 3,5; 5; 6; 7,5; 9; 10; 12,5; 15; 20 et 30 mM final). Une large gamme de concentrations d'ornithine a été testée pour vérifier qu'aux faibles concentrations d'ornithine les absorbances mesurées étaient fiables. Le protocole du dosage de l'activité OAT est identique à celui qui a été décrit dans les expériences précédentes. Les échantillons d'enzyme partiellement purifiée ont été incubés 20, 40 et 60 minutes à 37°C. Les dosages d'activité OAT ont été réalisés en triplicate pour chaque point de la cinétique et pour chaque concentration d'ornithine. Des « témoins négatifs » avec un tampon réactionnel dépourvu d' $\alpha$ -cétoglutarate ont été réalisés pour chaque point de la cinétique et pour chaque concentration d'ornithine.

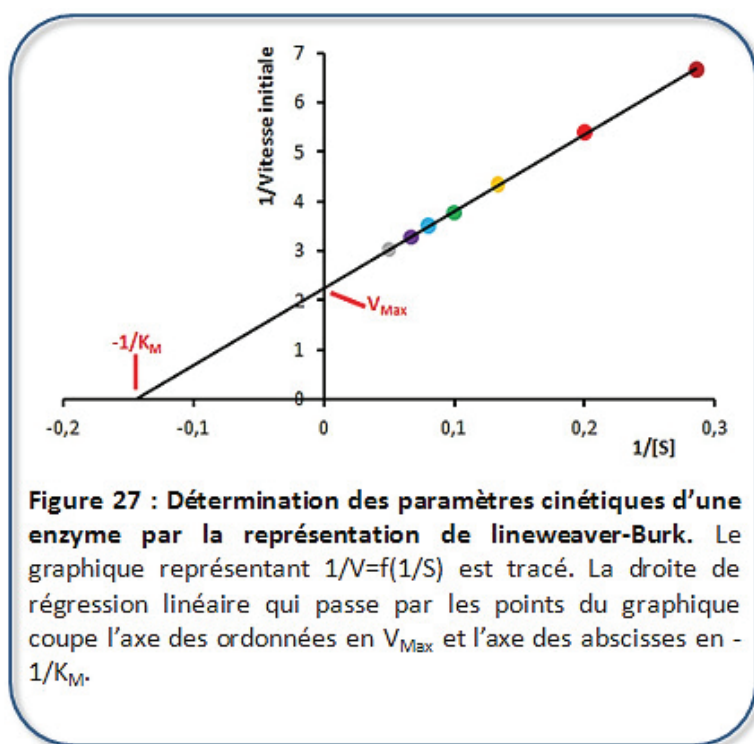
A partir des résultats obtenus, les concentrations finales d'ornithine qui ont été retenues pour déterminer le  $K_M$  et la  $V_{Max}$  sont : 0; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 et 20 mM. En fonction de l'organe étudié, un aliquot de 50 à 500  $\mu$ L de solution d'enzyme partiellement purifiée a été incubé 60 minutes à 37°C. Les dosages d'activité OAT ont été réalisés en duplicate.

Toutes les mesures d'activité OAT ont été effectuées à concentration fixe d' $\alpha$ -cétoglutarate (3,75 mM final) et de pyridoxal phosphate (0,45 mM final) et à l'abri de la lumière.

### III.4.2 - Détermination du $K_m$ et de la $V_{max}$

Il existe plusieurs méthodes de détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme. Une classiquement utilisée, la représentation de Lineweaver-Burk, et une méthode réputée pour être plus précise par les biochimistes, la représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden (Cornish-Bowden and Eisenthal, 1974; Eisenthal and Cornish-Bowden, 1974)

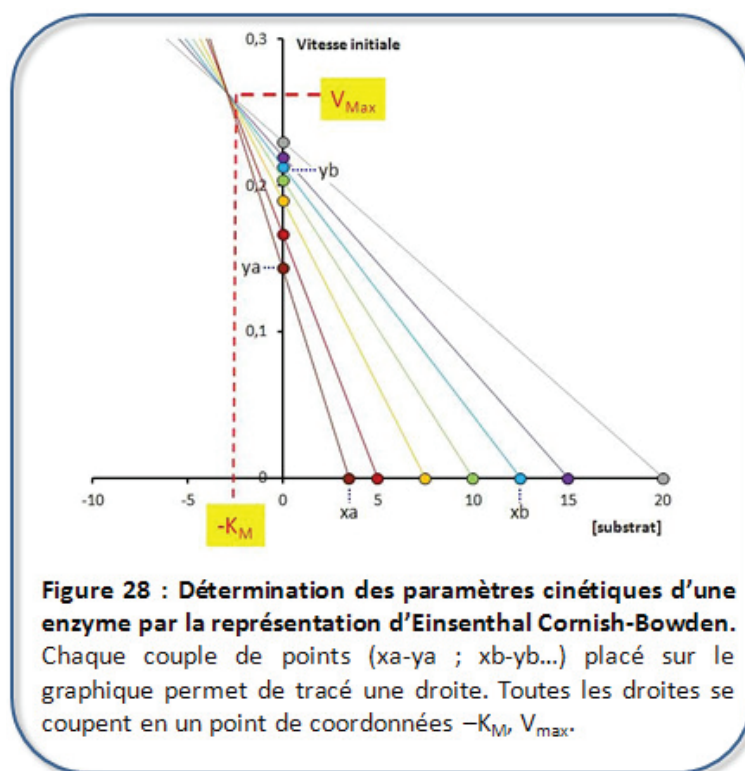
### III.4.3 - Représentation de Lineweaver-Burk



La représentation de Lineweaver-Burk prend en compte l'inverse des vitesses initiales mesurées en fonction de l'inverse des concentrations en substrats utilisées lors du dosage (Fig.27). La droite de régression linéaire passant par tous les points est tracée, et son intersection avec l'axe des ordonnées détermine la  $V_{max}$  et son intersection avec l'axe des abscisses permet de déterminer la valeur  $-1/K_m$ .

### III.4.4 - Représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden

La représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden est un peu plus compliquée à réaliser mais a l'avantage de ne pas nécessiter de transformation mathématique des résultats. Chaque valeur de vitesse initiale déterminée expérimentalement est placée sur l'axe des ordonnées, et chaque concentration en substrat utilisée lors du dosage est représentée sur l'axe des abscisses. Chaque couple de valeur « vitesse initiale – concentration en substrat » permet de tracer une droite (Fig. 28). En théorie, toutes les droites du graphique se croisent en un unique point d'intersection dont les coordonnées correspondent aux valeurs de  $-K_m$  et de  $V_{max}$  de l'enzyme. En réalité, si « n » concentrations de substrats ont été utilisées pour déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme, les « n » droites de la représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden se coupent en  $n(n-1)/2$  points d'intersections. Le point d'intersection médian des  $n(n-1)/2$  points d'intersection correspond aux valeurs de  $-K_m$  et de  $V_{max}$ .



Les valeurs obtenues avec les deux méthodes sont très comparables et aucune différence significative n'a été observée. Nous avons donc décidé de ne présenter que les résultats obtenus avec la méthode d'Eisenthal Cornish-Bowden dans notre étude.

	Foie	Rein	WAT	BAT	Muscle strié
Lineweaver-Burck	2,49 ± 0,21	5,43	2,97 ± 0,15	6,02	4,25 ± 0,11
Eisenthal Cornish-Bowden	2,54 ± 0,17	5,41	2,36 ± 0,08	5,72	4,24 ± 0,04

**Tableau 3 : Comparaison des valeurs de  $K_M$  de l'OAT obtenues par les représentations de Lineweaver-Burck et d'Eisenthal Cornish-Bowden dans quelques organes de souris mâles adultes.**

## IV – Statistiques

La normalité des distributions et l'homoscédasticité ont été testées respectivement avec le test de Shapiro et le test F d'égalité des variances pour savoir si des tests statistiques paramétriques peuvent être appliqués. Lorsqu'un test paramétrique peut être utilisé, la comparaison simple de deux moyennes a été réalisée avec le Test  $t$  de Student non apparié unilatéral, et l'analyse

de l'influence d'une variable explicative catégorielle sur plusieurs moyennes, *i.e.* la comparaison multiple de moyennes, avec une ANOVA (ANalysis Of VAriance) complétée par le test de Bonferroni/Dunnet pour la comparaison des moyennes deux à deux. Dans le cas où un test non paramétrique doit être utilisé, les analyses ont été réalisées avec le test U de Mann-Whitney ou le test de Kruskal-Wallis complété par un test U de Mann-Whitney. Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel StatView 5.0 (SAS Institute Inc., USA) à l'exception du test de Shapiro qui a été réalisé à l'aide d'un logiciel disponible sur internet (<http://dittami.gmxhome.de/shapiro/>).

**TRAVAUX**



**EXPERIMENTAUX**

# **ETUDE 1 : Cartographie de l'expression de l'OAT dans divers organes et tissus de souris mâles et femelles, paramètres cinétiques de l'enzyme.**

## **I - Introduction**

Comme nous l'avons déjà précisé dans les rappels bibliographiques, l'expression de l'*Oat* a été recherchée dans de nombreux organes chez le rat (Alonso & Rubio 1989; Herzfeld & Knox 1968; Herzfeld & Raper 1976b; Herzfeld & Raper 1976a; Mezl & Knox 1977; Wong *et al.* 1981; Levillain *et al.* 2005; Ravi Kumar *et al.* 2009), alors que très peu de travaux concernent la souris. Les quelques études existantes sont focalisées sur le foie, le rein et l'intestin, organes qui présentent la plus forte activité OAT (Riby *et al.* 1990; Lim *et al.* 1998; Yu *et al.* 2003; Levillain *et al.* 2005; Levillain *et al.* 2007; Ventura *et al.* 2009). Leurs résultats montrent une régulation de l'OAT qui semble spécifique de l'espèce et qu'une transposition rat/souris ne peut être envisagée. Il nous a donc paru important de rechercher l'expression génique et l'activité de l'OAT dans différents organes de souris mâles et femelles, la souris étant considérée comme un animal de référence en génétique. Nous avons ensuite caractérisé cette enzyme d'un point de vue biochimique par l'analyse de son inhibition et de ses paramètres cinétiques.

## **II - Matériels et méthodes spécifiques de l'étude**

### **II.1 - Animaux**

Des souris adultes mâles (35-40 g masse corporelle (MC)) et femelles (30-32 g MC) Swiss OF1 (Janvier, Le Genest-saint-Isle, France) ont été hébergées dans notre animalerie dont la température a été fixée à 25°C. L'éclairage de cette animalerie a fonctionné sur un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité avec un début d'éclairage à 6h00. Les animaux ont disposé *ad libitum* d'une boisson (eau du robinet) et d'une nourriture donnée sous forme de biscuits (2018 Teklad Global, Harlan, Gannat, France). Les composants majoritaires de ces biscuits sont: les glucides (76%), les protéines (18%), et les lipides (6%). La litière est constituée de copeaux de bois de résineux (SPPS, Vénissieux, France). Chaque semaine, la litière a été changée le mardi et le vendredi. L'humidité de la pièce a été maintenue à 40% ± 5%.



## **II.2 - Anesthésie et prélèvement des organes**

Les souris ont été anesthésiées comme décrit précédemment et les organes suivants ont été prélevés pour cette étude : les reins, le foie, les glandes surrénales, le tissu adipeux blanc, l'estomac, la rate, les testicules, les glandes de Tyson, les ovaires, l'utérus, le cœur, les poumons, le thymus, les glandes sous-maxillaires, le tissu adipeux brun, le cerveau, les quadriceps, les gastrocnémiens et les fémurs. Les organes entiers et chacune des portions d'organe disséquées ont été immédiatement congelés et ont été conservés dans un congélateur à -80°C.

## **II.3 - Recherche de l'expression de l'*Oat* dans les organes de souris par RT-PCR**

L'expression du gène de l'*Oat* a été recherchée par RT-PCR. Des amorces spécifiquement définies sur le gène de souris [sens (5'-TCCAGGATACCTGACAGGAGTT-3') et anti-sens (5'-ATCTTGTCTGCATTCTCAGCAA-3')] ont permis d'amplifier un fragment de 330 paires de bases. Les amplicons de chaque organe ont été analysés par électrophorèse.

## **II.4. Dosage de l'activité ornithine aminotransférase**

Les échantillons ont été préparés comme décrit précédemment, et l'activité OAT a été dosée selon la technique décrite dans le chapitre « Matériels et Méthodes » général.

### **II.4.1 - Détermination des conditions optimales du dosage de l'activité OAT pour chaque organe et tissu**

Les organes et tissus de 9 souris mâles et femelles ont été collectés. Un homogénat de chaque organe a été centrifugé et l'activité OAT a été mesurée comme décrit précédemment sur un surnageant provenant d'un mélange du même volume de chacun des 9 surnageants obtenus par organe. Ce mélange permet de mesurer une activité moyenne de l'OAT par organe en effaçant les éventuelles différences inter-animal. Pour déterminer les conditions optimales du dosage, l'activité OAT a été mesurée par période de 20 minutes pendant 80 minutes dans les différents organes. Nous avons dû allonger cette période d'incubation à 120 minutes pour le BAT interscapulaire (iBAT) dont l'activité était trop faible pour être mesurée avec précision en 80 minutes.

#### **II.4.2 - Spécificité de la réaction catalysée par l'OAT**

La spécificité de la réaction enzymatique catalysée par l'OAT a été vérifiée en incubant les échantillons préparés dans le § 4.1. en présence d'un inhibiteur spécifique et irréversible de l'OAT : la gabaculine (Jung & Seiler 1978). Les échantillons ont été préparés dans un volume final de 490 µL de tampon d'extraction au lieu de 500 µL et 10 µL de gabaculine (10 mM) ont été ajoutés soit avant le dosage de l'activité enzymatique (T = 0 min) soit 40 minutes après le début du dosage de l'activité enzymatique (T = 40 min) dans tous les organes sauf pour le iBAT (T = 60 min).

#### **II.4.3 - Etude de l'expression différentielle de l'activité ornithine aminotransférase**

L'expression différentielle de l'OAT dans les organes de souris mâles et femelles a été déterminée chez 9 souris. L'activité OAT a été mesurée sur 50 µL du surnageant provenant des homogénats du foie, des reins, des ovaires, de l'antre, du fundus, de l'utérus, des poumons, et des glandes de Tyson, 100 µL du surnageant provenant des homogénats du cerveau, des hémisphères, du cervelet, du tronc cérébral, de la rate, des fémurs, du cœur, et des glandes sous maxillaires, 150 µL du surnageant provenant des homogénats des iBAT et 200 µL du surnageant issu de l'homogénat des testicules, du thymus, des quadriceps, des triceps suraux, ou du WAT. Le temps d'incubation a été de 30 minutes pour le foie, 90 minutes pour l'iBAT et de 60 minutes pour tous les autres organes.

#### **II.4.4 - Détermination de l'activité ornithine aminotransférase mitochondriale (mtOAT) et cytosolique (cOAT)**

Les mitochondries et la fraction cytosolique ont été purifiées par centrifugation différentielle comme décrit dans le chapitre « Matériels et méthodes » général. Pour réaliser ces expériences, 4 à 12 souris mâles et 5 à 6 souris femelles ont été utilisées. Les activités mtOAT et cOAT ont été déterminées sur des échantillons de 50 µL de la fraction soluble des mitochondries et du cytosol. Les échantillons ont été incubés 60 minutes dans les conditions décrites précédemment dans le § 4.2. La spécificité de la réaction enzymatique a été vérifiée en ajoutant 10 µL de gabaculine (10 mM) avant le début de l'incubation.

## **II.5 - Dosage des protéines**

La concentration des protéines solubles a été déterminée par la méthode de Bradford (1976). La gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum bovin (0-30 µg BSA /µL). Chaque échantillon a été dosé en duplicate et l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 595 nm (UV 1800, Shimadzu).

## **II.6 - Détermination des paramètres cinétiques de l'OAT pour l'ornithine**

Les paramètres cinétiques de l'OAT pour l'ornithine ont été déterminés selon le protocole décrit dans le chapitre « Matériels et méthodes » général. Les échantillons ont été incubés en présence de 0; 5; 7,5; 10; 12,5; 15 et 20 mM finaux d'ornithine pendant 60 minutes à 37°C afin de déterminer les vitesses de réactions initiales de l'enzyme pour chaque concentration d'ornithine testée. Les paramètres cinétiques ont été déterminés en utilisant les représentations de Lineweaver-Burk et d'Eisenthal Cornish-Bowden et seuls les résultats obtenus à partir de la représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden ont été présentés.

## **II.7. Calculs et statistiques**

L'activité OAT a été exprimée en Unité Internationale (U.I.) : nmol P5C / mg de protéines solubles / minute (nmol P5C / mg prot / min) ou en nmol P5C/ mg de poids frais d'organe / minute (nmol P5C / mg FW / min).

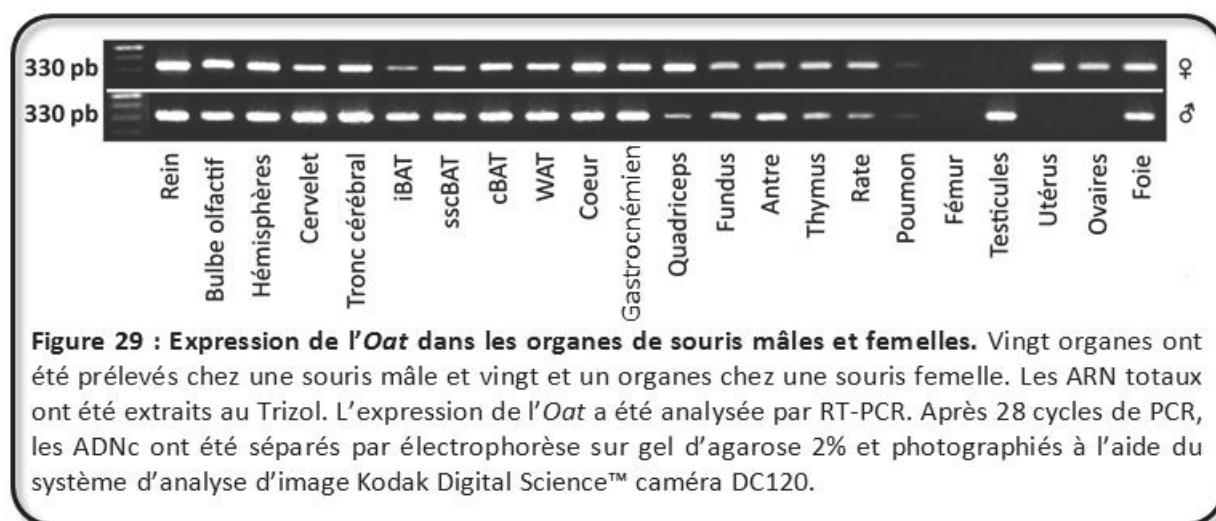
Les équations des droites de régression linéaires ainsi que les coefficients de détermination ( $R^2$ ) ont été calculés avec le logiciel Microsoft Excel. Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel StatView 5.0 (SAS Institute Inc., USA) à l'exception du test de Shapiro qui a été réalisé à l'aide d'un logiciel disponible sur internet :

(<http://dittami.gmxhome.de/shapiro/>).

## III. Résultats

### III.1. Expression génique de l'OAT dans les organes de souris mâles et femelles

Nous avons d'abord recherché l'expression du gène de l'OAT (*Oat*) dans un grand nombre d'organes et de tissus de souris. La taille du fragment d'ADNc obtenu (330 pb) correspond à la taille de l'amplicon défini par le choix des deux amorces. Nos résultats montrent que l'*Oat* a été détecté dans tous les organes et tissus étudiés à l'exception du fémur (Fig. 29). Les reins et le foie servent de contrôles positifs puisque l'expression de l'*Oat* dans ces organes a déjà été décrite dans la littérature. L'*Oat* est exprimé dans les différentes parties du cerveau, les tissus adipeux, le cœur, les muscles squelettiques, l'estomac, le thymus, la rate, les poumons et les organes sexuels. Bien que la RT-PCR semi quantitative ne donne qu'une évaluation approximative de l'expression de l'*Oat*, nous distinguons nettement une variation de l'intensité des bandes obtenues pour chaque organe (Fig29). Ces résultats nous conduisent donc à vérifier si la présence du gène correspond vraiment à une activité OAT dans tous les organes de souris mâles et femelles.



### III.2 - Activité OAT dans les organes de souris

#### III.2.1 – Mise au point du dosage de l'activité OAT

Le dosage de l'activité OAT est un dosage colorimétrique qui s'appuie sur la loi de Beer-Lambert. Il est donc indispensable de déterminer les limites et les conditions optimales du dosage enzymatique de l'OAT pour chaque organe qui exprime ce gène chez les souris mâles et femelles. Les paramètres volume de l'échantillon et temps d'incubation ont été analysés au cours d'expériences pilotes.

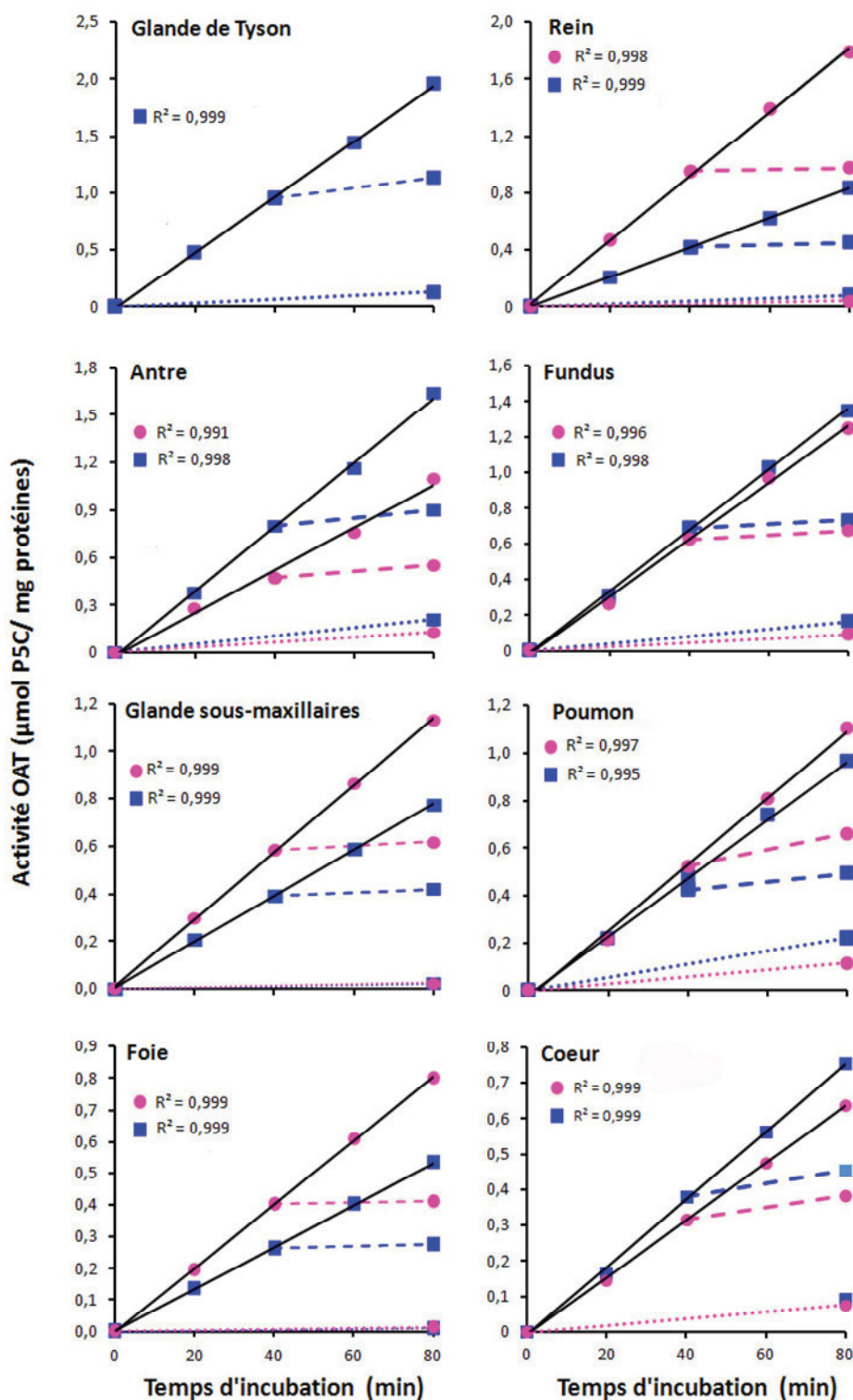
Le volume d'échantillon à incuber a été déterminé pour chaque organe de manière à obtenir une différence ( $\Delta$ ) d'absorbance (Absorbance échantillon – absorbance blanc) la plus élevée possible. Ces volumes sont de 50  $\mu$ L pour le foie, l'utérus, les ovaires, les poumons, les glandes de Tyson, l'antré et le fundus, de 100  $\mu$ L pour les reins, la rate, les glandes sous maxillaires, les fémurs, le cœur, les hémisphères, le cervelet, le bulbe rachidien et le cerveau et de 200  $\mu$ L pour les testicules, le thymus, le WAT, le BAT, les quadriceps et les gastrocnémiens.

Nous avons ensuite étudié la stabilité de la réaction catalysée par l'OAT en fonction du temps d'incubation pour le volume d'échantillon déterminé. Pour chaque organe de souris mâle et femelle, nos résultats montrent clairement que l'activité OAT augmente proportionnellement et linéairement en fonction du temps d'incubation. Ce temps est d'au moins 80 min pour l'ensemble des organes à l'exception du BAT (Fig. 30). Pour ce dernier, compte tenu de sa faible activité OAT, le temps d'incubation a été prolongé jusqu'à 120 min et nous avons vérifié que l'activité OAT du iBAT est proportionnelle au temps d'incubation pendant au moins ces 120 minutes (Fig. 30). Pour tous les organes, d'excellents coefficients de détermination ( $R^2$ ), proches de 1 ( $R^2 > 0.99$ ) ont été obtenus.

En fonction de l'activité OAT mesurée, les organes peuvent être répartis en trois clusters. Le premier cluster regroupe les organes dont la production de P5C en 80 min est supérieure à 1,0  $\mu$ mole P5C / mg protéines à savoir : les deux portions de l'estomac (antré et fundus), les poumons, les glandes de Tyson, les glandes sous-maxillaire de femelle et les reins de femelle. Le second cluster est composé d'organes dont la synthèse de P5C est comprise entre 1,0 et 0,45  $\mu$ mole P5C / mg protéines / 80 min : le foie, le cœur, le fémur, les organes sexuels des femelles, les glandes sous-maxillaire de mâle et les reins de mâle. Le dernier cluster regroupe les organes dont l'activité OAT est inférieure à 0,45  $\mu$ mole P5C / mg protéines / 80 min : les trois principales parties du cerveau, les muscles squelettiques, les tissus adipeux brun et blanc, les testicules, le thymus et la rate. De plus, nos résultats révèlent une différence d'activité OAT entre les mâles et les femelles pour un même organe. Par exemple, l'activité OAT des reins, des glandes sous-maxillaires, du foie, du thymus et du WAT des femelles est supérieure à celle mesurée dans les mêmes organes des mâles. A l'inverse, l'activité OAT du BAT et de l'antré des souris mâles est supérieure à celle mesurée dans les mêmes organes des femelles.

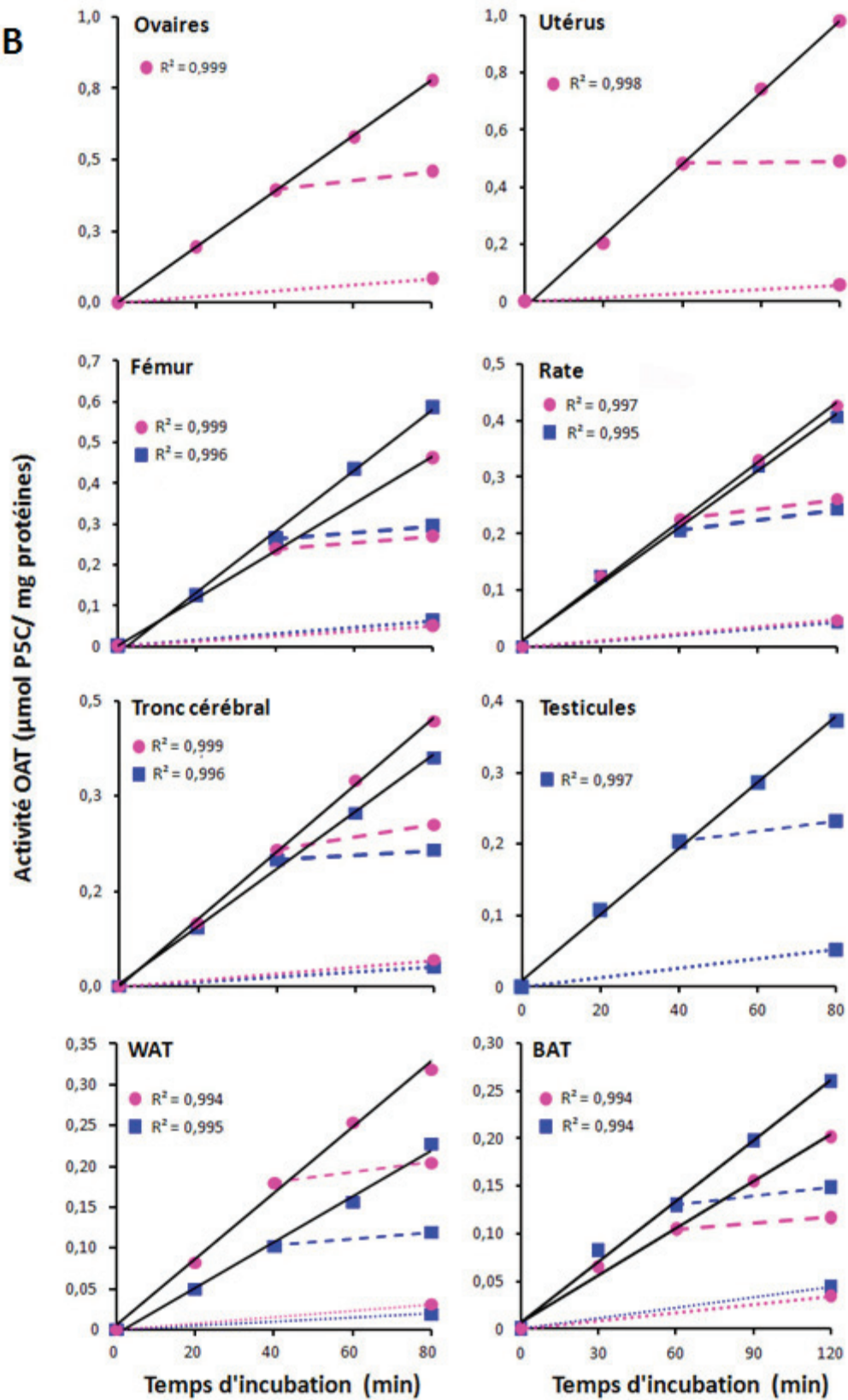
Nous nous sommes enfin assurés que la réaction biochimique étudiée était spécifiquement catalysée par l'OAT. La spécificité de la réaction de transamination de l'ornithine par l'OAT a été vérifiée par l'adjonction d'un inhibiteur, la gabaculine soit avant le début de la réaction

enzymatique soit au milieu de l'étude cinétique de cette réaction. Lorsque 10  $\mu$ L de gabaculine (10 mM) sont ajoutés au milieu réactionnel avant le début de la réaction enzymatique, l'activité OAT est inhibée en moyenne de  $90,5 \pm 0,9\%$  dans les organes de souris mâles et de  $91,3 \pm 1,0\%$  dans ceux des femelles (Tableau 4). La gabaculine inhibe à plus de 98% l'activité OAT dans le foie de souris mâles et femelles (98,4% et 98,5% respectivement) et c'est dans le BAT des souris mâles et femelles qu'elle est la moins efficace (83%). L'ajout de gabaculine à 40 ou 60 min inhibe la réaction en cours avec quasiment la même efficacité.

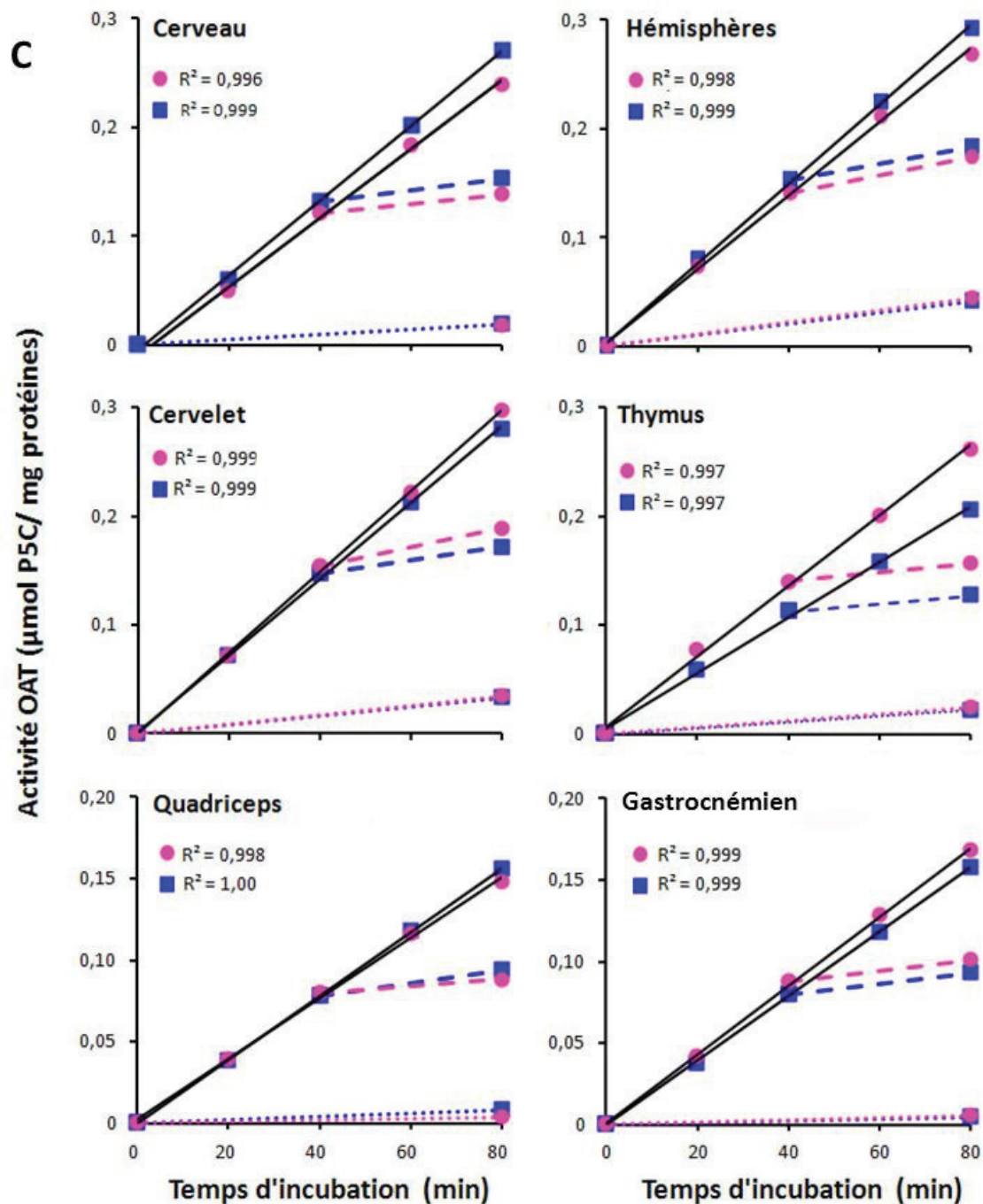




**B**







**Figure 30 : Détermination du temps d'incubation pour le dosage de l'activité OAT dans les organes de souris.** Cercle : femelles, Carré : mâles. La gabaculine (100  $\mu\text{M}$  final) a été ajoutée soit avant l'incubation (T0, pointillés) soit au bout de 40 minutes (T40, tirets) ou bien de 60 minutes pour le BAT. Les organes ont été collectés à partir de 9 souris. Pour chaque organe, la fraction soluble de 9 organes a été mixée pour doser l'activité OAT. Chaque symbole correspond à la moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 3$  dosages. Les activités sont exprimées en  $\mu\text{mol P5C} / \text{mg protéines}$ . Les coefficients de détermination ( $R^2$ ) et de corrélation ( $r$ ) ont été calculés à l'aide Microsoft Excel. La valeur de  $P$  a été déterminée dans la Table des coefficients de corrélation.  $P < 0,01$  dans tous les cas. **A** : Organes dont la production de P5C est comprise entre 0,8 et 2  $\mu\text{mol P5C} / \text{mg prot}$ ; **B** : Organes dont la production de P5C est comprise entre 0,8 et 0,25  $\mu\text{mol P5C} / \text{mg prot}$ ; **C** : Organes dont la production de P5C est inférieure à 0,25  $\mu\text{mol P5C} / \text{mg prot}$ .

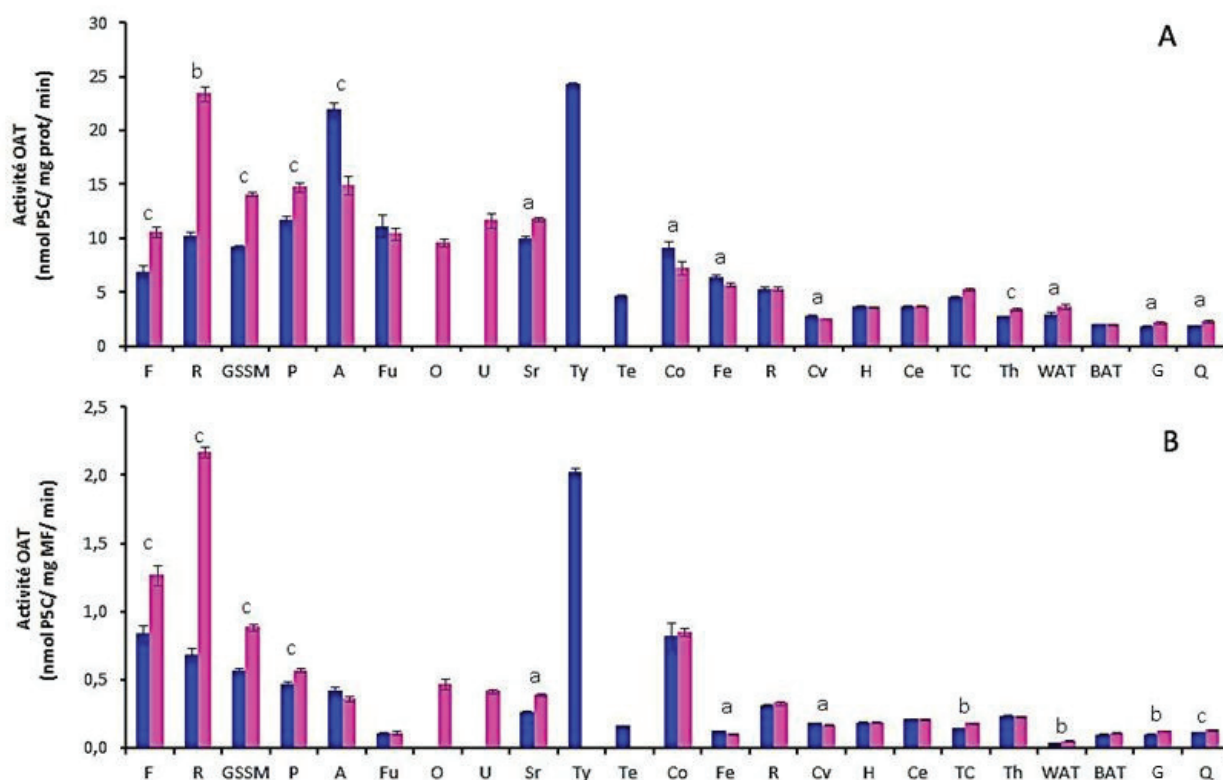
	% inhibition	
	Mâles	Femelles
	T0	T0
<b>Foie</b>	98,4	98,5
<b>Reins</b>	90,3	97,7
<b>Cerveau</b>	92,9	92,8
« Hémisphères »	85,7	83,5
« Cervelet »	88,1	88,4
« Tronc cérébral »	91,6	90,0
<b>BAT</b>	83,0	83,0
<b>WAT</b>	91,3	90,3
<b>Antre</b>	87,9	92,6
<b>Fundus</b>	87,2	88,0
<b>Rate</b>	89,5	88,6
<b>Coeur</b>	87,6	87,9
<b>Poumon</b>	88,9	89,7
<b>Thymus</b>	89,4	90,7
<b>Glandes sous-maxillaires</b>	97,1	97,8
<b>Utérus</b>		94,1
<b>Ovaires</b>		89,2
<b>Testicules</b>	86,1	
<b>Glande de Tyson</b>	93,4	
<b>Quadriceps</b>	94,8	97,6
<b>Gastrocnémien</b>	97,2	96,9
<b>Fémur</b>	89,9	90,1
<b>Moyenne</b>	90,5	91,3
<b>SEM</b>	0,9	1,0

**Tableau 4 : Inactivation de l'activité OAT par la gabaculine dans les différents organes de souris.** La gabaculine a été ajoutée soit avant l'incubation de l'échantillon (T0), soit 40 minutes après le début de l'incubation (T40) ou bien 60 minutes après le début de l'incubation dans le cas duBAT.

### III.2.2 – Interprétation des résultats

Les résultats de cette étude exprimés cette fois en U.I. (nmol P5C / mg prot / min) montrent très clairement que l'activité OAT varie très fortement en fonction de l'organe et du sexe de l'animal (Fig. 31). Les activités OAT les plus importantes sont mesurées dans la glande de Tyson, l'antre et le rein. Les activités OAT les plus faibles sont observées dans les 3 subdivisions du cerveau, les tissus adipeux, les muscles striés squelettiques, le thymus et le testicule. Les autres organes ont une activité OAT intermédiaire. Un dimorphisme sexuel de l'activité OAT est mis en évidence dans 13 des organes étudiés (test *t* de Student ; *P* < 0,05). L'activité OAT des souris femelles est supérieure à celle des souris mâles dans le foie, le rein, la glande sous-maxillaire, le poumon, la glande surrénale, le thymus, le WAT, le triceps sural et le quadriceps. A l'inverse,

l'activité OAT des souris mâles est supérieure à celle des souris femelles dans l'antre, le cœur, le fémur et le cerveau.



**Figure 31 : Activité OAT dans les organes de souris mâles et femelles.** Vingt-trois organes ont été prélevés chez les souris mâles et femelles. A : activité OAT exprimée en U.I (nmol P5C/ mg prot/ min). B : activité OAT exprimée en nmol P5C/ mg MF/ min. Selon l'organe, un volume de 50, 100, 150 ou 200µL de surnageant a été incubé à 37°C pendant 60 minutes à l'exception du foie (30 minutes) et du BAT (90 minutes). Foie (F), Rein (R), Glande sous-maxillaire (GSSM), Poumon (P), Antre (A), Fundus (Fu), Ovaires (O), Utérus (U), Surrénales (Sr), Glande de Tyson (Ty), Testicule (Te), Cœur (Co), Fémur (Fe), Rate (Ra), Cerveau (Cv), Hémisphères (H), Cervelet (Ce), Tronc Cérébral (TC), Thymus(Th), Tissu adipeux blanc (WAT), Tissu adipeux brun (BAT), Gastrocnémien (G), Quadriceps (Q). Bleu : mâles, rose : femelles. Moyenne  $\pm$  SEM, n=9 animaux par organe et par sexe sauf pour les glandes de Tyson (n=8). Test t de Student non apparié unilatéral ; mâles vs femelles ; <sup>a</sup>P<0,05, <sup>b</sup>P<0,005, <sup>c</sup>P<0,0001.

La concentration en protéines solubles d'un échantillon varie en fonction de l'organe mais aussi du sexe de l'animal (Tableau 5).

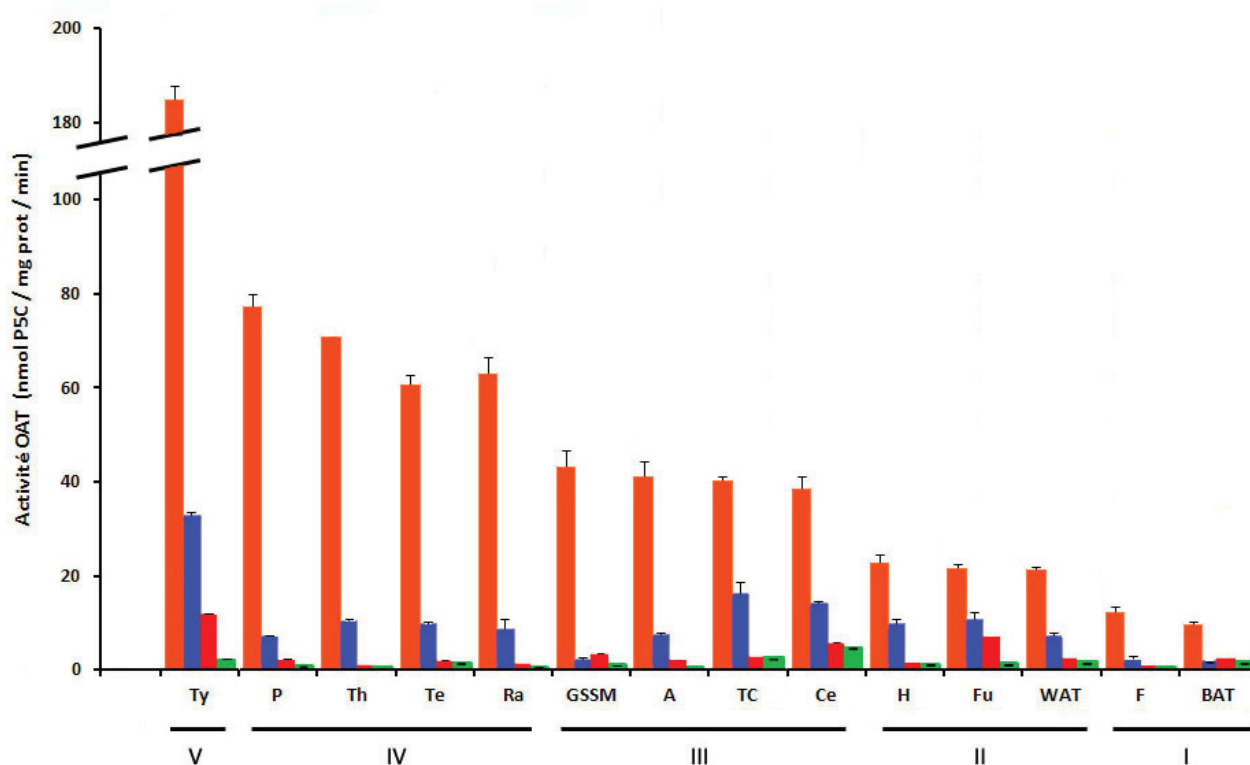
	Mâles	Femelles	P
BAT	4,89 ± 0,37	5,55 ± 0,26	NS
WAT	1,25 ± 0,06	1,39 ± 0,08	NS
Cerveau	13,12 ± 0,35	13,04 ± 0,44	NS
Hémisphères	10,15 ± 0,07	10,37 ± 0,11	NS
Cervelet	11,47 ± 0,12	11,45 ± 0,09	NS
Tronc cérébral	6,22 ± 0,12	6,95 ± 0,18	0,0104
Cœur	6,13 ± 0,48	4,44 ± 0,37	0,0243
Gastrocnémien	5,61 ± 0,16	5,92 ± 0,17	NS
Quadriceps	6,30 ± 0,27	5,97 ± 0,23	NS
Fémur	1,95 ± 0,14	1,87 ± 0,03	NS
Foie	12,26 ± 0,34	11,97 ± 0,35	NS
Antre	1,93 ± 0,17	2,51 ± 0,22	NS
Fundus	1,06 ± 0,12	1,08 ± 0,13	NS
Poumon	4,03 ± 0,13	3,90 ± 0,12	NS
Rate	5,97 ± 0,22	6,22 ± 0,13	NS
Rein	6,75 ± 0,48	9,31 ± 0,23	0,0005
Thymus	8,46 ± 0,09	6,78 ± 0,07	0,0003
Glande surrénale	0,89 ± 0,01	1,14 ± 0,02	< 0,0001
Glande sous-maxillaire	6,14 ± 0,08	6,30 ± 0,17	NS

**Tableau 5 : Concentration des protéines solubles dans les organes de souris mâles et femelles.** Les concentrations en protéines solubles sont exprimées en mg / mL. Moyenne ± SEM n=9 souris. Mâles vs femelles, test U de Mann-Whitney.

Lorsque les résultats sont exprimés en U.I., les différences de concentrations de protéines solubles peuvent augmenter ou diminuer artificiellement l'activité OAT. Pour nous affranchir des variations de concentrations en protéines solubles observées entre les différents organes, les activités OAT ont été exprimées en nmol P5C / mg masse fraîche / min. Le rein et la glande de Tyson ont toujours les activités OAT les plus fortes. En revanche, les activités OAT de l'antre, du fundus, de la glande surrénale et du testicule sont plus faibles et le dimorphisme sexuel de l'activité OAT est confirmé dans le foie, le rein, la glande sous-maxillaire, le poumon, la glande surrénale, le fémur, le cerveau, le tronc cérébral, le WAT et les muscles striés squelettiques. A l'inverse, plus aucun dimorphisme sexuel n'est observé dans l'antre, le cœur et le thymus.

### III.2.3 – Activité OAT dans les fractions mitochondriales et cytosolique des organes de souris mâles.

L'activité OAT mitochondriale (mOAT) diffère grandement entre les 14 organes étudiés (Fig. 32), ce qui nous a permis de regrouper ces organes en 5 clusters. La glande de Tyson, qui compose le premier cluster est l'organe qui a la plus forte activité mOAT. Le deuxième cluster est composé de la rate, du testicule, du thymus et du poumon qui ont une activité mOAT comprise entre 60 et 80 U.I. Les organes qui composent le cluster III, à savoir, le cervelet, le tronc cérébral, l'antre et la glande sous-maxillaire, ont une activité mOAT comprise entre 30 et 45 U.I. Le WAT, le fundus et l'hémisphère, composent le cluster II et ont une activité mOAT comprise entre 20 et 30 U.I. Enfin, le cluster V, regroupe le BAT et le foie, qui expriment une faible activité mOAT (inférieure à 12 U.I.).



**Figure 32 : Activité OAT dans la fraction mitochondriale (mOAT) et la fraction cytosolique (cOAT) des principaux organes de souris mâles.** Les mitochondries ont été isolées par centrifugation différentielle dans le tissu adipeux brun (BAT), le foie (F), le tissu adipeux blanc total (WAT), le fundus (Fu), l'hémisphère (H), le cervelet (Ce), le tronc cérébral (TC), l'antre (A), la glande sous-maxillaire (GSSM), la rate (Ra), le testicule (Te), le thymus (Th), le poumon (P) et la glande de Tyson (Ty). Orange : mitochondries, bleu : mitochondries + 10  $\mu$ L gabaculine (10 mM), rouge : fraction cytosolique, vert : fraction cytosolique + 10  $\mu$ L gabaculine (10 mM). Moyenne  $\pm$  esm sauf pour le thymus. Nombre d'expérience n = 2 pour Th ; n = 3 pour Fu ; n = 4 pour BAT, A, GSSM, Ra, Te, P et Ty ; n = 5 pour WAT, H, et Ce ; n = 6 pour F. 1 à 4 animaux par expérience.

Cette répartition des organes est quasiment similaire à celle établie précédemment en prenant en compte l'activité OAT tissulaire sauf pour le foie qui présente une activité OAT mitochondriale curieusement basse. Il faut noter que, pour chaque organe, l'activité mOAT est bien supérieure à celle mesurée sur la globalité du tissu. Elle peut être multipliée par 25 dans le thymus par exemple. L'ajout de gabaculine au milieu de réaction inhibe fortement l'activité mOAT (81,9% à 95,1% d'inhibition). Cependant, la réaction catalysée par l'OAT dans la fraction mitochondriale du WAT, du fundus et du cerveau est plus faiblement inhibée (51,2% à 66,1% d'inhibition). Comme nous nous y attendions, l'activité cOAT est très faible en comparaison de l'activité mOAT. En effet, elle ne représente que 1,1 à 7,3% de l'activité mOAT. Seuls les tissus adipeux, le fundus et le cervelet ont une activité cOAT plus forte (10,8% à 32,4% de l'activité mOAT). L'ajout de gabaculine au milieu de réaction inhibe plus ou moins efficacement l'activité cOAT. En effet, l'activité cOAT est inhibée de 11,9% (tronc cérébral) à 90,4% (thymus).

### **III.3 - Détermination des paramètres cinétiques de l'OAT**

#### **III.3.1 - Mesure de la constante d'affinité ( $K_m$ ) de l'OAT pour l'ornithine dans les organes de souris mâles et femelles**

La constante de Michaelis ( $K_m$ ) qui représente l'affinité de l'OAT pour l'ornithine a été déterminée dans les organes de souris mâles et femelles à l'aide de la représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden (Tableau 6). L'affinité de l'OAT pour l'ornithine varie non seulement d'un organe à l'autre mais aussi en fonction du sexe. En effet, le BAT de souris mâles est l'organe dont l'affinité de l'OAT pour l'ornithine est la plus faible ( $K_m = 5,72$  mM) et l'antre de souris femelles est l'organe dont l'OAT a la plus forte affinité pour l'ornithine ( $K_m = 0,815$ ). Nos résultats mettent en évidence une différence significative d'affinité de l'OAT pour l'ornithine entre les mâles et les femelles pour tous les organes à l'exception du cœur, du quadriceps et de l'antre.

	Mâles		Femelles		Mann-Whitney
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	
<b>Foie</b>	2,54	0,17	4,97	0,10	0,0495
<b>Rein</b>	3,98	N.D	4,82	N.D	N.D
<b>Cerveau</b>	2,79	N.D	3,28	N.D	N.D
<b>Hémisphères</b>	2,90	0,06	4,27	0,02	0,0495
<b>Cervelet</b>	1,24	0,05	3,36	0,06	0,0495
<b>Tronc cérébral</b>	4,16	N.D	4,21	N.D	N.D
<b>BAT</b>	5,72	N.D	3,92	N.D	N.D
<b>WAT</b>	2,36	0,08	5,49	0,04	0,0143
<b>Cœur</b>	5,12	0,02	5,17	0,01	NS
<b>Gastrocnémien</b>	4,58	0,02	2,65	0,04	0,0143
<b>Quadriceps</b>	4,24	0,04	4,22	0,29	0,0275
<b>Fundus</b>	4,38	N.D	3,54	N.D	N.D
<b>Antre</b>	4,01	0,02	0,81	0,02	0,0495
<b>Thymus</b>	3,55	N.D	3,59	N.D	N.D
<b>Rate</b>	2,57	0,01	4,55	0,01	0,0339
<b>Poumon</b>	5,52	0,02	5,17	0,06	0,0495
<b>Fémur</b>	1,96	0,03	3,77	0,01	0,0495
<b>Glandes ss maxillaire</b>	2,36	0,01	4,97	0,02	0,0495
<b>Glandes de Tyson</b>	5,37	N.D	N.A	N.A	N.A
<b>Testicules</b>	5,36	0,15	N.A	N.A	N.A

**Tableau 6 : Détermination par la représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden de la constante d'affinité ( $K_m$ ) de l'OAT pour l'ornithine dans les organes de souris mâles et femelles.** Les valeurs de  $K_m$  sont exprimées en mM d'ornithine. N=1 à 5 expériences. N.D : non déterminé, N.A : non applicable. Les différences entre les mâles et les femelles ont été testées à l'aide du test de Mann-Whitney, NS : non significatif.



### III.3.2 - Mesure de la vitesse maximale de réaction ( $V_{\max}$ ) de l'OAT pour l'ornithine dans les organes de souris mâles et femelles

La vitesse maximale de réaction ( $V_{\max}$ ) de l'OAT pour l'ornithine a été déterminée dans les organes de souris mâles et femelles à l'aide de la représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden (Tableau 7). Les valeurs de vitesse maximale obtenues pour les différents organes sont similaires aux valeurs de vitesse de réaction enzymatique mesurées et présentées dans la figure 31. Cependant, le dimorphisme sexuel des activités enzymatiques mesurées précédemment n'est pas automatiquement retrouvé lors de la détermination des vitesses maximales de réaction. Ainsi, aucun dimorphisme sexuel n'est observé pour la  $V_{\max}$  dans le cœur ou le gastrocnémien alors qu'une différence d'activité OAT était mesurée entre les sexes dans la figure 31.

	Mâles		Femelles		Mann-Whitney
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	<i>P</i>
<b>Foie</b>	7,03	0,05	10,00	0,08	0,0495
<b>Rein</b>	11,47	N.D	25,63	N.D	N.D
<b>Cerveau</b>	3,31	N.D	2,94	N.D	N.D
<b>Hémisphères</b>	3,75	0,03	3,79	0,04	N.S
<b>Cervelet</b>	4,26	0,06	4,26	0,04	N.S
<b>Tronc cérébral</b>	5,12	N.D	5,76	N.D	N.D
<b>BAT</b>	2,08	N.D	2,11	N.D	N.D
<b>WAT</b>	3,10	0,02	4,63	0,06	0,0143
<b>Cœur</b>	10,40	0,15	8,29	0,11	NS
<b>Gastrocnémien</b>	2,47	0,01	2,59	0,14	N.S
<b>Quadriceps</b>	2,33	0,01	2,80	0,11	0,0143
<b>Fundus</b>	12,53	N.D	11,64	N.D	N.D
<b>Antre</b>	32,04	0,63	24,16	0,41	0,0495
<b>Thymus</b>	3,23	N.D	3,86	N.D	N.D
<b>Rate</b>	15,76	8,35	7,19	0,06	N.S
<b>Poumon</b>	12,39	0,07	15,30	0,04	0,0495
<b>Fémur</b>	8,65	0,01	8,40	0,08	0,0495

<b>Glandes ss maxillaire</b>	14,50	0,15	14,50	0,15	0,0495
<b>Glandes de Tyson</b>	32,47	N.D	N.A	N.A	N.A
<b>Testicules</b>	4,99	0,08	N.A	N.A	N.A

**Tableau 7 : Détermination par la représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden de la vitesse maximale de réaction ( $V_{\max}$ ) de l'OAT pour l'ornithine dans les organes de souris mâles et femelles.** Les valeurs de  $V_{\max}$  sont exprimées en nmol P5C/ mg protéines/ minute. n =1 à 5 expériences. N.D : non déterminé, N.A : non applicable

## IV – Discussion

Cette première étude a permis de confirmer le caractère ubiquitaire de l'OAT et d'élargir la cartographie de son expression à divers organes et tissus inexplorés chez la souris. C'est ainsi que nous avons détecté les ARNm codant pour l'OAT dans 22 organes et tissus de souris et nous avons vérifié qu'à cette expression génique correspondait bien une activité OAT détectable. Cette activité est mitochondriale et inhibée par la gabaculine, inhibiteur spécifique de l'OAT. Ces investigations menées de manière simultanées chez les souris mâles et femelles ont permis de montrer pour la première fois un dimorphisme sexuel de l'activité OAT dans 13 des organes étudiés.

Nous avons d'abord utilisé la RT-PCR pour identifier les organes qui expriment le gène de l'OAT. Le faible nombre d'échantillons par organe et l'absence de gène de référence ne nous a pas permis d'envisager une quantification de l'expression des ARNm codant pour l'OAT. Nous pouvons néanmoins noter la variation des intensités des bandes obtenues sur le gel d'électrophorèse pour chaque organe. Un seul tissu est négatif, le fémur. Ces résultats sont en accord avec ceux de Yu *et al.* 2003 qui ont exploré quelques organes chez la souris : le foie, le rein, l'estomac, le thymus, le poumon, l'utérus et la glande de Tyson. Bien que l'intestin possède une forte activité OAT (Riby *et al.* 1990), il n'a pas été étudié dans ce travail. En effet, nous nous sommes spécifiquement intéressés au catabolisme de l'ornithine, or, l'OAT intestinale catalyse la réaction inverse, *i.e.*, la synthèse d'ornithine à partir du glutamate (Windmueller & Spaeth 1974; Herzfeld & Raper 1976; Ross *et al.* 1978; Windmueller & Spaeth 1980; Jones 1985; Matsuzawa *et al.* 1994).

Nous avons ensuite vérifié que l'expression du gène correspond bien à une activité OAT mesurable dans tous les organes et tissus sélectionnés. Classiquement et de manière restrictive, l'activité OAT est étudiée dans le foie, le rein et l'intestin qui ont un rôle coopératif et permettent une régulation du flux d'acides aminés d'origine intestinale vers les tissus périphériques (Herzfeld & Knox 1968; Ross *et al.* 1978; Jones 1985; Levillain *et al.* 2000). Notre étude, beaucoup plus large, montre que l'activité OAT détectée dans d'autres organes est similaire à celle du rein et du foie (glandes sous-maxillaires, poumon, fundus) ou supérieure (antre et glandes de Tyson). De plus, certains organes qui présentent une faible activité OAT pourraient avoir un rôle non négligeable dans le métabolisme des acides aminés si l'on rapporte l'activité OAT à la masse totale du tissu. C'est ainsi que le muscle squelettique, le WAT et le BAT dont l'activité OAT (par mg de protéines ou par mg de tissu) est relativement faible pourraient au final contribuer de manière non négligeable au catabolisme de l'ornithine et ceci d'autant plus que ce sont des tissus qui peuvent s'hypertrophier dans certaines conditions comme l'exposition au froid ou l'obésité.

Une grande variabilité des valeurs de l'activité OAT est observée en fonction des différents organes de souris mâles et femelles. L'existence d'un dimorphisme sexuel de l'activité OAT est observée dans 13 des organes étudiés. Ainsi, d'une manière générale, les activités OAT mesurées chez les souris femelles sont supérieures à celles détectées chez les souris mâles à l'exception de celles qui ont été détectées dans l'antre, le cœur et le cerveau. Ce dimorphisme avait été précédemment montré au niveau du rein (Levillain *et al.* 2005b, 2007) et du foie de souris (Ventura *et al.* 2009) où l'activité OAT peut être deux à trois fois supérieure chez les femelles comparativement aux mâles. Une régulation par les hormones sexuelles a été recherchée et des différences apparaissent encore entre le rat et la souris. Les œstrogènes sont connus pour réguler l'activité OAT rénale chez le rat (Herzfeld & Knox 1968; Wu 1979; Mueckler & Pitot 1983; Mueckler *et al.* 1984) alors que chez la souris c'est la testostérone qui serait impliquée dans cette même régulation (Manteuffel-Cymborowska *et al.* 1995; Levillain *et al.* 2005b). Se pose alors la question de la régulation de l'OAT dans les autres organes de souris ? Nous testerons l'hypothèse de la testostérone dans la suite de notre travail.

Comment expliquer un dimorphisme sexuel restreint à certains organes alors que selon la littérature, l'OAT est codée par un seul et unique gène (Mitchell *et al.* 1988; O'Donnell *et al.* 1988; Ramesh *et al.* 1988; Ramesh *et al.* 1992) et que la testostérone régule négativement l'expression de l'*Oat* au niveau transcriptionnel (Levillain *et al.*, 2011) ? L'hypothèse d'une

régulation post-traductionnelle, probablement organe dépendante, nécessite de plus amples investigations.

L'utilisation de la gabaculine a inhibé très fortement l'activité enzymatique mesurée dans les organes entiers ou dans les mitochondries isolées prouvant que la réaction enzymatique mesurée est bien la réaction catalysée par l'OAT. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études qui montrent que l'activité OAT hépatique est inhibée *in vitro* de 90% par 10-12  $\mu\text{M}$  de gabaculine (Alonso & Rubio 1989) ou par injection de gabaculine (50 mg/ kg) à des souris (Jung & Seiler 1978). Comme Alonso et Rubio (1989), nous n'avons obtenu qu'une inhibition partielle de l'activité OAT dans certains organes notamment le cerveau. Ces auteurs rapportent même qu'une augmentation de la concentration en gabaculine d'un facteur 30 est nécessaire pour obtenir une inhibition similaire à celle obtenue dans les autres organes. Étonnamment, une nouvelle forme d'OAT résistante au 5-fluoromethylornithine (5-FMO), un autre inhibiteur de l'OAT, et logiquement appelée « OAT 5FMO résistante » a été découverte dans certains tissus de souris (Daune & Seiler 1988; Daune *et al.* 1988). Cette « OAT 5-FMO résistante » montre, en fonction du tissu étudié, une plus ou moins grande capacité à être inhibée par la gabaculine (Daune et al. 1988; Alonso & Rubio 1989). L'existence d'une telle forme d'OAT dans les différents organes de notre étude pourrait expliquer les variations du pourcentage d'inhibition de l'activité OAT observées en présence de gabaculine.

Pour poursuivre la caractérisation de l'OAT dans les différents tissus, nous avons déterminé les paramètres cinétiques de l'OAT dans chaque organe et pour chaque sexe. Les valeurs de  $V_{\max}$  obtenues dans les différents organes des souris mâles et femelles sont très proches de la vitesse de réaction que nous avons mesurée lors de la détermination de l'activité enzymatique de l'OAT dans chaque organe, confirmant ainsi nos résultats précédents. Il semble que les  $V_{\max}$  de l'OAT mesurées chez les femelles soient souvent plus élevées que celles mesurées chez les mâles. Nous avons aussi observé des différences de  $K_m$  entre les organes et entre les souris mâles et femelles, avec un  $K_m$  généralement plus fort chez les souris femelles comparativement aux souris mâles. Un  $K_m$  élevé signifie que l'affinité de l'OAT des souris femelles pour l'ornithine est plus faible que celle des mâles, mais cette affinité plus faible semble être compensée par une vitesse maximale de réaction plus grande. Une telle différence de  $K_m$  entre les organes et les sexes pourrait s'expliquer par une différence de concentrations en protéines OAT. En effet, il a été montré dans le foie de rats (Boernke *et al.* 1981) que lorsque la concentration en protéine OAT est augmentée, les dimères d'OAT composant la forme active de l'OAT s'agrègent

pour former des structures de taille plus importante, provoquant ainsi une augmentation du  $K_m$  de l'OAT *i.e.* une diminution de l'affinité de l'OAT pour l'ornithine. Des résultats semblables ont été observés dans l'intestin et le foie de souris (Lim *et al.* 1998). Ce regroupement en plusieurs dimères d'OAT causerait une gêne stérique limitant l'accessibilité au site catalytique et expliquant ainsi la diminution de l'affinité de l'OAT pour l'ornithine.

*En conclusion, cette étude préliminaire nous a permis de caractériser l'activité de l'OAT dans de nombreux organes et tissus de souris dont certains pourraient jouer un rôle encore insoupçonné dans le catabolisme de l'ornithine. Elle nous a également permis de mettre en évidence un dimorphisme sexuel de l'activité OAT dans tous les organes et tissus explorés sauf le cerveau, le cœur et l'antre. Ces résultats nous permettent d'envisager une étude plus fonctionnelle, sur une série d'organes sélectionnés (foie, poumon, muscle squelettique, tissus adipeux blanc et brun, cerveau et cœur). Nous étudierons l'ontogénèse de l'activité OAT chez la souris en ciblant deux facteurs qui pourrait potentiellement impacter le catabolisme de l'ornithine : l'apport protéique induit par le sevrage et l'imprégnation hormonale de la puberté.*

## Etude 2 : Expression de l'OAT au cours du développement postnatal de la souris mâle et femelle

### I - Introduction

La souris fait partie des animaux qui achèvent leur maturation au cours du développement postnatal, période critique où l'organisme doit faire face à des contraintes métaboliques (croissance, sevrage, puberté) qui l'obligent à réguler finement les flux inter-organes d'acides aminés. Parmi les acides aminés, l'arginine et le L-ornithine, substrat de l'OAT, ont un rôle essentiel dans de nombreuses voies métaboliques en tant que précurseurs de la L-proline, L-glutamate, L-glutamine, L-citrulline, L'arginine est donc un acide aminé indispensable à la croissance des animaux (Borman & Wood 1946; Milner *et al.* 1974). Pourtant, l'apport d'arginine par le lait maternel est insuffisant pour couvrir les besoins des individus en pleine croissance (Davis *et al.* 1993). L'OAT joue donc un rôle essentiel dans la gestion des stocks d'arginine par sa capacité à synthétiser de l'ornithine au niveau intestinal ; ornithine qui, à son tour, peut fournir de l'arginine *via* la citrulline et le cycle de l'urée, dans le foie puis dans le rein. Ces caractéristiques sont largement illustrées par l'invalidation du gène codant pour l'Oat qui entraîne la mort des souriceaux rapidement après leur naissance (Wang *et al.* 1995). L'apport protéique est donc d'une importance majeure pour la régulation de l'activité OAT. Nous avons donc analysé cette activité OAT en ciblant la période du sevrage des souriceaux et en mesurant les conséquences d'un sevrage précoce.

Soumise à différents types de régulation notamment hormonale, l'expression de l'OAT varie de façon espèce et tissu spécifique au cours du développement postnatal (Herzfeld & Knox 1968; Rähä & Kekomäki 1968; Herzfeld & Greengard 1969; Volpe *et al.* 1969; De Jonge *et al.* 1998; Levillain *et al.* 2007). Dans la première étude nous avons montré l'existence d'un fort dimorphisme sexuel de l'activité OAT dans un certain nombre d'organes et tissus vitaux des souris adultes (*foie, rein, poumon, muscle squelettique, tissus adipeux blanc et brun*). Or, les données bibliographiques montrent que les stéroïdes sexuels ont une action différente sur l'activité OAT, selon l'espèce et l'organe considéré. Pour exemple, les œstrogènes régulent positivement l'activité OAT dans le rein mais pas dans le foie de rat, (Herzfeld & Knox 1968; Lyons & Pitot 1977; Mueckler & Pitot 1983; Mueckler *et al.* 1984; Levillain *et al.* 2004) alors que chez la souris, la testostérone induit une diminution de l'activité OAT rénale (Levillain *et al.*

2005) et n'a aucun effet sur l'activité OAT hépatique (Bulfield & Hall, 1981). Il nous a donc paru important d'analyser l'apparition du dimorphisme sexuel dans les différents organes et tissus murins et de vérifier le rôle de la testostérone dans la régulation de cette activité OAT.

L'objectif final étant de définir les facteurs qui modulent l'activité OAT dans chaque organe vital et d'analyser ainsi la contribution de chaque organe à l'équilibre du flux azoté au cours de la croissance postnatale.

## **II. Matériels et méthodes spécifiques de l'étude**

### **II.1 - Animaux**

Des souris mâles et femelles Swiss adultes aptes à la reproduction ont été achetées chez un fournisseur (Janvier - Le Genest-Saint-Isle, France). Les souris ont été accouplées à raison d'un mâle pour deux femelles dans une cage de dimensions 15 x 34 x 16 cm (l x L x h). Lorsque les souris femelles ont présenté des signes de gestation, le mâle a été retiré et les femelles ont été hébergées en cages individuelles. Le jour de la mise bas a été noté J0. Les souris mâles et femelles ont été euthanasiées précisément 5, 10, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 30, 35, 40 et 45 jours après leur naissance. De 6 à 12 animaux ont été utilisés en fonction de la masse des tissus afin d'obtenir 6 mesures par jour de la cinétique. Les souriceaux ont été sevrés 21 jours après la naissance et les mâles ont été séparés des femelles. Pendant la période d'accouplement les souris ont disposées *ad libitum* de boisson (eau du robinet) et d'aliment présenté sous la forme de biscuits (2018 Teklad Global, Harlan, Gannat, France). Ces biscuits sont composés majoritairement de protéines (18%), glucides (76%) et lipides (6%). Dès les premiers signes de gestation, lors du retrait du mâle, et jusqu'au moment du sevrage des souriceaux, les femelles ont été nourries par un aliment enrichi en protéines [20% protéines (SPPS, Safe, Vénissieux, France)] en raison des besoins accrus en protéines pendant la gestation et l'allaitement (Beaton *et al.* 1954; Naismith & Morgan 1976; Millican *et al.* 1987). Après le sevrage, les souriceaux ont disposé *ad libitum* de l'aliment 2018.

Pour étudier l'impact du sevrage sur l'expression de l'OAT, 18 souriceaux mâles et 18 souriceaux femelles ont été séparés précocement de leur mère à l'âge de 18 jours. Les souriceaux ont été sacrifiés 1, 2 ou 3 jours après le sevrage à raison de 6 animaux par point de la cinétique d'étude.

Pour étudier l'impact de la testostérone sur l'activité OAT, 8 souris mâles orchidectomisées chirurgicalement ont été achetées chez le fournisseur (Janvier) et ont été sacrifiées 18 jours après leur opération.

Les souris ont été hébergées dans une animalerie dont la température a été fixée à 25°C pour que les animaux soient maintenus à une température ambiante proche de la thermoneutralité. L'humidité de l'animalerie a été maintenue à  $40 \pm 5\%$  et l'éclairage a fonctionné sur un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité (début d'éclairage à 07h00). La litière est constituée de copeaux de bois de résineux (SPPS, Vénissieux, France) et a été changée 2 fois par semaine.

## **II.2 - Anesthésie des animaux et prélèvement des organes**

Les animaux ont été anesthésiés comme décrit dans le chapitre « Matériels et méthodes » général. Le sang ainsi que les organes suivants ont été prélevés : le foie, le cœur, les poumons, le WAT, les muscles gastrocnémiens, quadriceps femoris et triceps brachiaux, le BAT, et le cerveau. Les organes ont été immédiatement congelés et stockés à -80°C.

## **II.3 - Dosage de la concentration plasmatique de la corticostérone et de la testostérone**

La concentration plasmatique en corticostérone des souriceaux mâles et femelles a été déterminée par RIA (radioimmunoassay) selon la technique décrite par Filipinski et collaborateurs (2002). 3 mL de diethyl éther ont été rajoutés à 5  $\mu$ L de plasma, le résidu a été dissous dans 100  $\mu$ L de tampon de réaction avant d'être incubé avec un anticorps anti-corticostérone de souris fait chez le lapin, et de la 1,2,6,7[<sup>3</sup>H]corticostérone.

La concentration plasmatique en testostérone des souriceaux mâles a été également mesurée par RIA selon la technique décrite par Déchaud *et al.* (1989).

## **II.4 - Dosage de l'activité OAT**

Les échantillons ont été préparés et l'activité OAT mesurée selon les techniques décrites dans le chapitre « Matériels et méthodes » général et les mises au point établies dans la première étude.



## **II.5 - Dosage des protéines**

La concentration des protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (1976) décrite précédemment. Une gamme étalon d'albumine de sérum bovin a été réalisée. Les dosages ont été effectués en duplicate et les absorbances ont été mesurées au spectrophotomètre à 595 nm.

## **II.6 - Calculs et statistiques**

Les données ont été interprétées comme précédemment en utilisant les tests de Shapiro, F d'égalité des variances, ANOVA complétée par un test de Bonferroni / Dunnett, *t* de Student, Kruskal-Wallis ou U de Mann-Whitney. Les équations des droites de régression linéaire ont été comparées à l'aide d'une ANCOVA (ANalysis of COVariance).

# **III. Résultats**

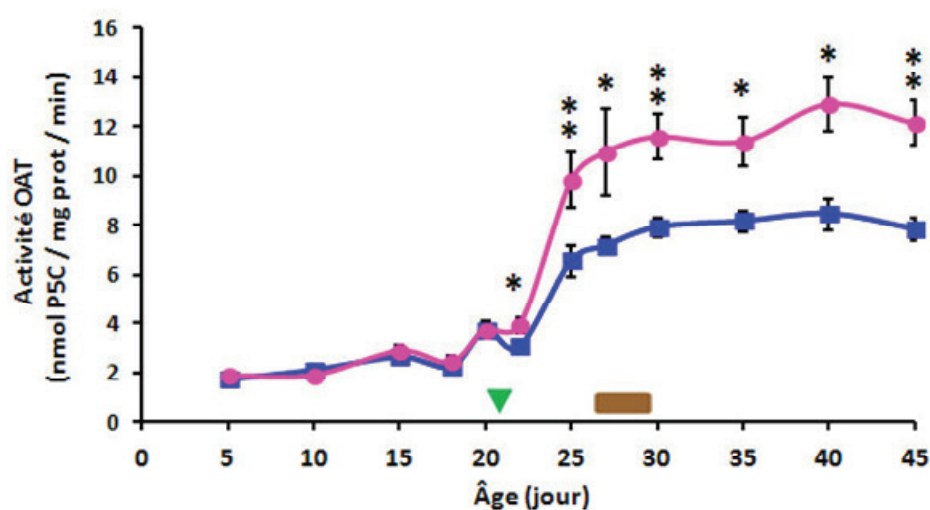
## **III.1 – Ontogénèse de l'activité OAT dans les organes et tissus de souris qui présentent un dimorphisme sexuel chez l'adulte**

L'activité OAT a été mesurée dans le foie, le poumon, le muscle squelettique, les tissus adipeux blanc et brun qui présentent un dimorphisme sexuel de l'activité OAT chez l'adulte. Nous avons ajouté deux organes qui n'en présentent pas chez l'adulte : le cœur et le cerveau pour vérifier l'absence de dimorphisme sexuel même en période pré-pubertaire et pubertaire. Les mesures ont été effectuées selon une cinétique précise à 5, 10, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 30, 35, 40 et 45 jours après la naissance du souriceau. Les résultats ont été analysés pour chaque organe.

### **III.1.1 – Le foie**

L'activité OAT hépatique des souriceaux mâles et femelles varie en fonction de l'âge et du sexe (ANOVA 2,  $F_{\text{âge}} = 67$ ,  $F_{\text{sexe}} = 55$ ,  $P < 0,001$ ), (Fig. 33). Elle augmente très progressivement entre J5 et J25 et les valeurs sont très similaires entre les mâles et les femelles. A partir de J22, l'activité OAT augmente fortement, d'un facteur 2,5 chez les mâles et d'un facteur 3 chez les femelles

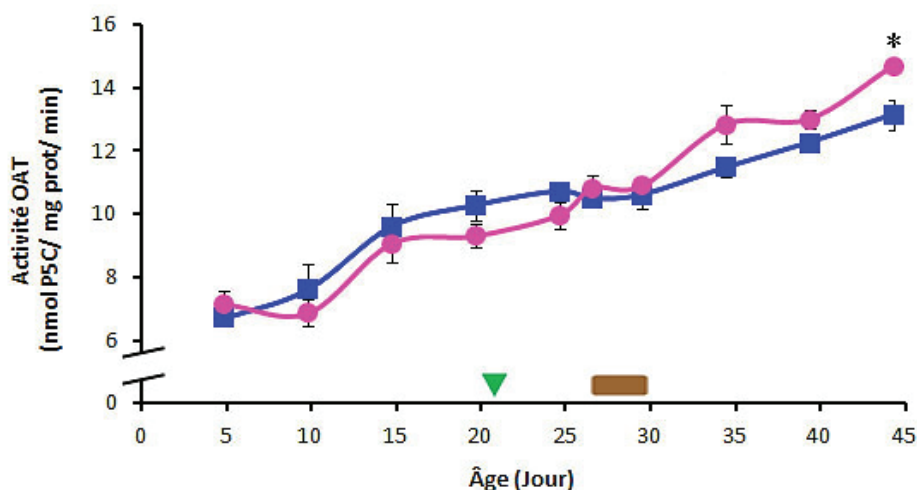
(Bonferroni Dunnett, J22 vs J45,  $P < 0,0001$ ). L'activité OAT des femelles reste constamment supérieure à celle des mâles de J25 à J45 (Test  $t$  de Student, mâles vs femelles,  $P < 0,05$  ou  $P < 0,005$ ), illustrant la mise en place du dimorphisme sexuel de l'activité OAT dans le foie (Fig. 33).



**Figure 33 : Activité OAT hépatique au cours du développement postnatal des souriceaux mâles et femelles.** Bleu : mâles ; rose : femelles ; triangle vert : sevrage des animaux à 21 jours, rectangle marron : mise en place de la sécrétion des hormones sexuelles. Les animaux ont été euthanasiés de 5 à 45 jours après leur naissance. Les souriceaux ont été sevrés à 21 jours. Les dosages de l'activité OAT ont été effectués à partir d'un volume de 50 $\mu$ L d'homogénat centrifugé et incubé 80 minutes à 37°C. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 6$  à 13 souriceaux par jour et par sexe. Test  $t$  de Student, mâle vs femelle, \*  $P < 0,05$  et \*\*  $P < 0,005$ .

### III.1.2 - Le poumon

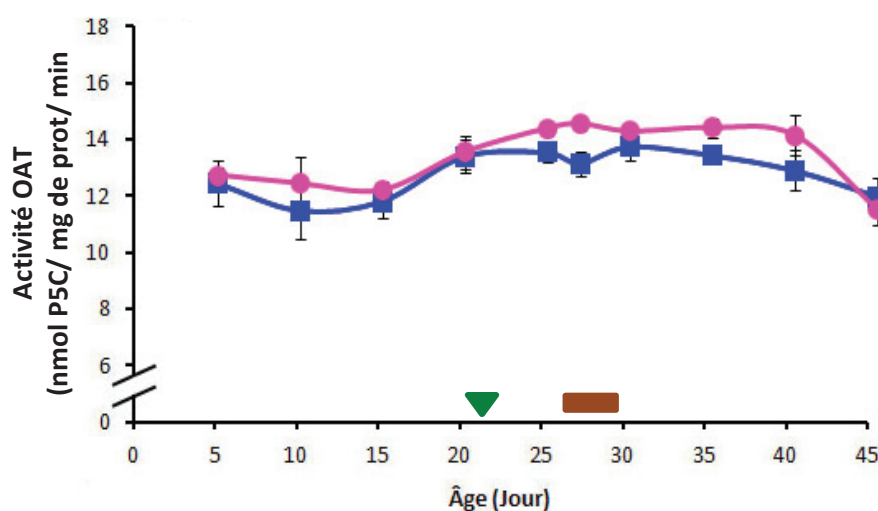
L'activité OAT pulmonaire des souris mâles et femelles augmente tout au long du développement postnatal (Fig. 34). L'analyse statistique révèle que cette augmentation est linéaire (Régression linéaire ;  $R_{\text{mâles}} = 0,855$  ;  $F_{\text{mâles}} = 160$  ;  $R_{\text{femelles}} = 0,916$  ;  $F_{\text{femelles}} = 308$  ;  $P < 0,0001$ ). Les équations des droites de régressions linéaires symbolisant l'augmentation de l'activité OAT pulmonaire au cours du développement postnatal sont :  $Y = 6,612 + 0,145X$  pour les mâles et  $Y = 5,695 + 0,189X$  pour les femelles. Les équations des droites de régression linéaire sont significativement différentes l'une de l'autre (ANCOVA ;  $F = 4,39$  ;  $P < 0,02$ ). Au cours du développement postnatal, l'activité OAT pulmonaire des souris mâles augmente de 94% ( $6,74 \pm 0,17$  vs  $13,09 \pm 0,47$  nmol P5C / mg prot / min ; Mann-Whitney ;  $P < 0,003$ ), et celle des souris femelles augmente de 104% ( $7,18 \pm 0,44$  vs  $14,63 \pm 0,23$  nmol P5C / mg prot / min) ; Mann-Whitney ;  $P < 0,003$ ). Enfin, l'activité OAT des souris femelles à J45 est significativement supérieure à celle des mâles (Mann-Whitney ;  $P < 0,02$ ).



**Figure 34 : Activité OAT mesurée dans le poumon des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.** Bleu : mâles, rose : femelles, triangle vert : sevrage des animaux à 21 jours, rectangle marron : mise en place de la sécrétion des hormones sexuelles. Les animaux ont été sacrifiés de 5 à 45 jours après leur naissance. Les animaux sont sevrés à 21 jours et ont disposés *ad libitum* d'eau du robinet et de biscuits secs (2018 Teklad Global, Harlan, Gannat, France). Les dosages de l'activité OAT ont été effectués à partir d'un volume de 50µL d'homogénat centrifugé incubé 80 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n = 6 à 7 souriceaux par jour et par sexe. Mann-Whitney ; mâles vs femelles ; \*  $P < 0,02$ .

### III.1.3 - Le cœur

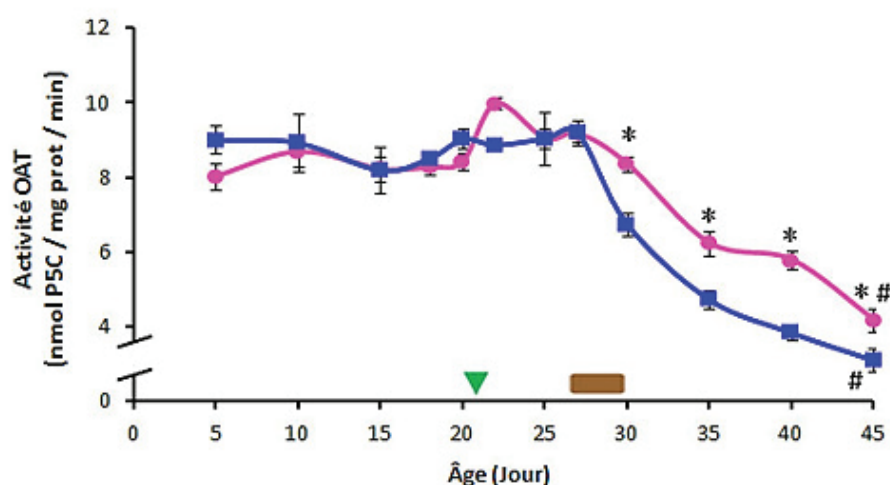
L'activité OAT reste stable dans le cœur tout au long des 45 jours de croissance postnatale. Aucune différence significative n'a été observée entre les mâles et les femelles (Fig. 35).



**Figure 35 : Activité OAT mesurée dans le cœur des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.** Bleu : mâles, rose : femelles, triangle vert : sevrage des animaux à 21 jours, rectangle marron : mise en place de la sécrétion des hormones sexuelles. Les dosages de l'activité OAT ont été effectués à partir d'un volume de 100µL d'homogénat centrifugé et incubé 80 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n = 6 à 12 souriceaux par jour et par sexe.

### III.1.4 - Le tissu adipeux blanc (WAT)

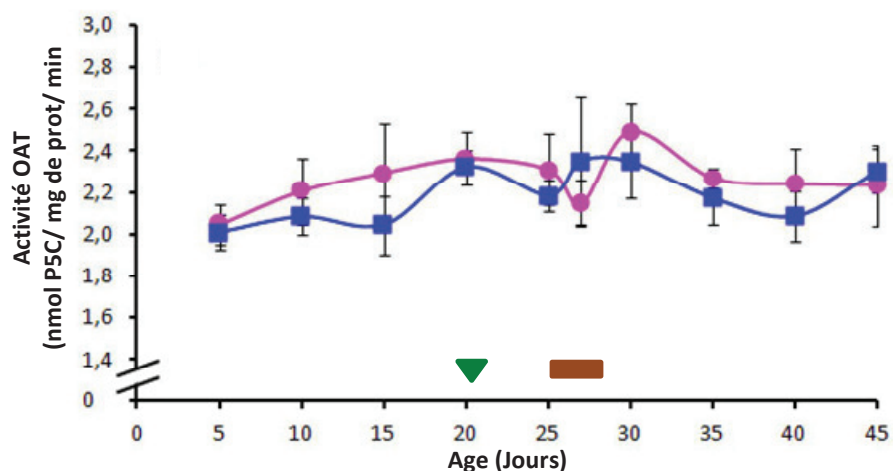
De J5 à J27, les activités OAT moyennes mesurées dans le WAT des souris mâles et femelles sont quasiment constantes et similaires (moyennes des 6 premières valeurs, mâles vs femelles :  $8,85 \pm 0,12$  vs  $8,73 \pm 0,23$  nmol P5C / mg prot / min), (Fig. 36). A partir de J27, date d'apparition des hormones sexuelles, l'activité OAT diminue régulièrement et de manière significative (ANOVA 2 ;  $F_{\text{sexe}} = 47$  ;  $F_{\text{âge}} = 123$  ;  $P < 0,0001$ ) aussi bien chez les mâles que chez les femelles (ANOVA 1 ;  $F_{\text{mâles}} = 74$  ;  $F_{\text{femelles}} = 53$  ;  $P < 0,0001$ ), (Fig. 36). Les valeurs mesurées chez les mâles sont toutefois toujours inférieures à celles mesurées chez les femelles (test *t* de Student ;  $P < 0,003$ ) et la diminution est plus importante chez les mâles [diminution de 66% ( $9,20 \pm 0,33$  vs  $3,11 \pm 0,31$  nmol P5C / mg prot / min; Bonferroni / Dunnett ;  $P < 0,0001$ ) chez les mâles, et de 54% ( $9,17 \pm 0,23$  vs  $4,19 \pm 0,32$  nmol P5C / mg prot / min; Bonferroni / Dunnett ;  $P < 0,0001$ ) chez les femelles]. Le dimorphisme sexuel de l'activité OAT est ainsi confirmé dans le WAT ; à J45, l'activité OAT des souris femelles est 1,34 fois supérieure à celle des souris mâles (Fig. 36).



**Figure 36 : Activité OAT mesurée dans le WAT des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.** Bleu : mâles, rose : femelles, triangle vert : sevrage des animaux à 21 jours, rectangle marron : mise en place de la sécrétion des hormones sexuelles. Les dosages de l'activité OAT ont été effectués à partir d'un volume de 200µL d'homogénat centrifugé et incubé 80 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 6$  à 12 souriceaux par jour et par sexe. Test de Bonferroni / Dunnett ; J27 vs J45 ; \* $P < 0,0001$ . Test *t* de Student ; mâles vs femelles ; \* $P < 0,003$ .

### III.1.5 - Le tissu adipeux brun (BAT)

Contrairement à l'activité OAT du tissu adipeux blanc, l'activité OAT du tissu adipeux brun reste stable pendant la période postnatale et ne présente pas de variation significative entre les mâles et les femelles (Fig. 37).



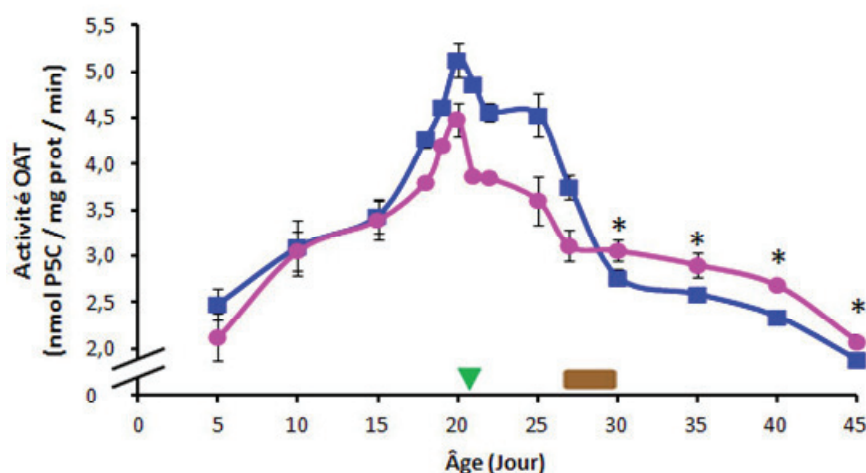
**Figure 37 : Activité OAT mesurée dans le BAT des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.** Bleu : mâles, rose : femelles, triangle vert : sevrage des animaux à 21 jours, rectangle marron : mise en place de la sécrétion des hormones sexuelles. Les dosages de l'activité OAT ont été effectués à partir d'un volume de 150  $\mu$ L d'homogénat centrifugé et incubé 80 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 6$  à 12 souriceaux par jour et par sexe.

L'importance des SEM pour chaque point de mesure pourrait expliquer l'absence d'apparition du dimorphisme sexuel pourtant observé chez l'adulte dans la première étude.

### III.1.6 - Le tissu musculaire squelettique

#### III.1.6.1 - Le quadriceps

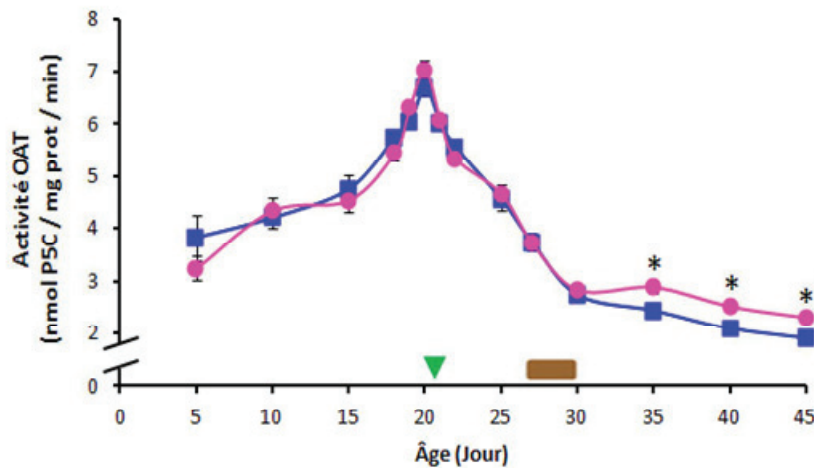
Chez les souris mâles et femelles, l'activité OAT augmente à partir de J5 et atteint un pic à J20 (mâles : +107%, femelles : +112%). De J20 à J45, l'activité OAT du quadriceps des mâles et des femelles diminue. Chez les souris mâles, l'activité OAT diminue de 63% ( $5,13 \pm 0,19$  vs  $1,88 \pm 0,07$  nmol P5C / mg prot / min). Chez les souris femelles, l'activité OAT diminue de 54% ( $4,49 \pm 0,17$  vs  $2,08 \pm 0,07$  nmol P5C / mg prot / min). Il semble que cette diminution se fasse en deux temps avec un léger décalage de 3 jours chez le mâle. Il est ainsi possible de définir 2 phases de diminution de l'activité OAT pour chaque sexe : chez le mâle, une diminution brutale de J20 à J30 est suivie par une diminution plus progressive de J30 à J45 ; chez la femelle, la phase de diminution brutale s'arrête à J27 et laisse la place à une diminution plus progressive, les valeurs de l'activité OAT à chaque point (J30, 35, 40, 45) restant toujours plus élevées que celles des mâles (Mann-Whitney ;  $P < 0,05$ ) (Fig. 38).



**Figure 38 : Activité OAT mesurée dans le quadriceps des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.** Bleu : mâles, rose : femelles, triangle vert : sevrage des animaux à 21 jours, rectangle marron : mise en place de la sécrétion des hormones sexuelles. Les dosages de l'activité OAT ont été effectués à partir d'un volume de 200 $\mu$ L d'homogénat centrifugé incubé 80 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n = 6 souriceaux par jour et par sexe. Test U de Mann-Whitney ; mâles vs femelles ; \* $P < 0,0035$ .

### III.1.6.2 - Le muscle gastrocnémien

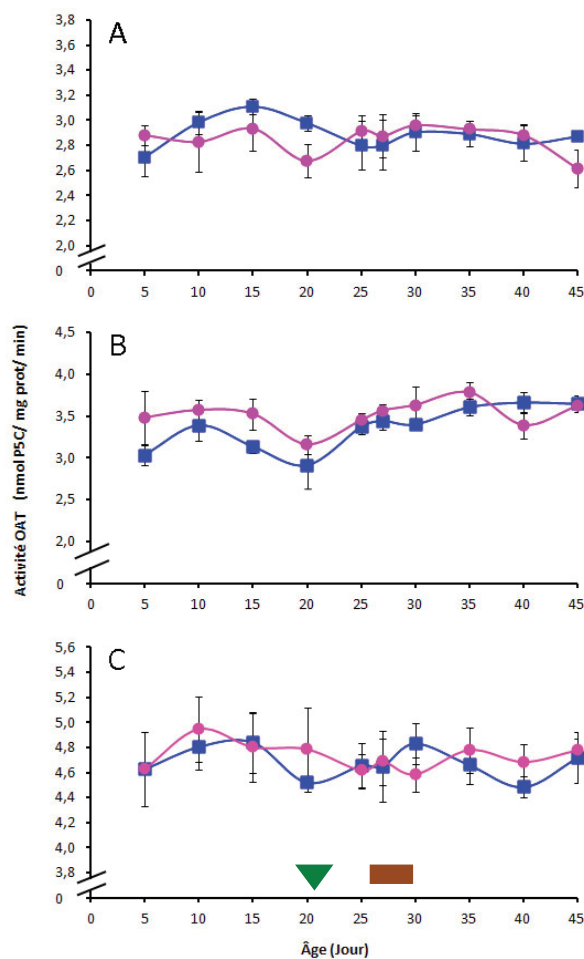
L'activité OAT du gastrocnémien des souris mâles et femelles au cours du développement postnatal suit le même profil de variation que celui observé pour le quadriceps (Fig. 39). De J5 à J20, l'activité OAT des souris mâles et femelles augmente fortement et atteint son pic. L'augmentation est de 75,2% pour les souris mâles et de 117,2% pour les souris femelles. Comme pour le quadriceps, l'activité OAT diminue de J20 à J45 [de 72% ( $6,71 \pm 0,18$  vs  $1,89 \pm 0,08$  nmol P5C / mg prot / min) chez les mâles et de 67% ( $7,04 \pm 0,19$  vs  $2,31 \pm 0,07$  nmol P5C / mg prot / min) chez les femelles]. Cette diminution se produit également en deux phases mais de manière coordonnée pour les deux sexes : une phase de diminution brutale de J20 à J30, superposable mâle/femelle, puis une phase de diminution très progressive durant laquelle les valeurs mesurées chez les femelles sont toujours supérieures à celles mesurées chez les mâles (Mann-Whitney ;  $P < 0,02$ ).



**Figure 39 : Activité OAT mesurée dans le gastrocnémien des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.** Bleu : mâles, rose : femelles, triangle vert : sevrage des animaux à 21 jours, rectangle marron : mise en place de la sécrétion des hormones sexuelles. Les dosages de l'activité OAT ont été effectués à partir d'un volume de 200 $\mu$ L d'homogénat centrifugé et incubé 80 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n = 6 souriceaux par jour et par sexe. Test U de Mann-Whitney ; mâles vs femelles ; \*P < 0,03.

### III.1.7 - Le cerveau

Nous n'avons pas observé de dimorphisme sexuel de l'activité OAT dans le cerveau des souris adultes. Il nous a néanmoins semblé intéressant d'explorer l'OAT cérébral au cours de la



période post natale, en fonction des deux conditions qui peuvent être critiques pour cette enzyme : le sevrage et la puberté.

Les résultats montrent que l'activité OAT fluctue faiblement dans les trois parties du cerveau (hémisphères, cervelet, tronc cérébral) aussi bien chez les mâles que chez les femelles mais aucune différence significative n'a été observée.

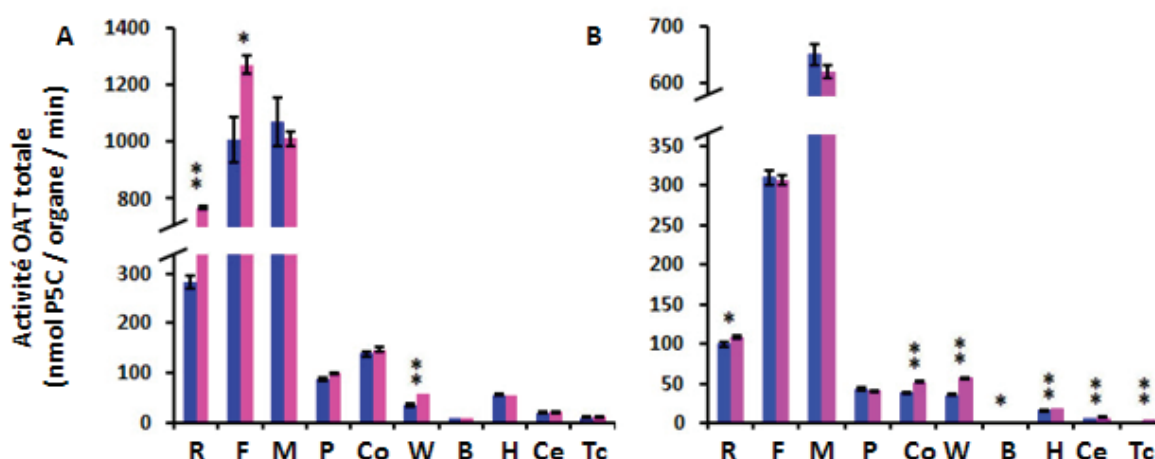
**Figure 40 : Activité OAT mesurée dans les hémisphères, le cervelet et le tronc cérébral des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.** Bleu : mâles, rose : femelles, A : hémisphères, B : cervelet, C : tronc cérébral. Les dosages de l'activité OAT ont été effectués à partir d'un volume de 100 $\mu$ L d'homogénat centrifugé et incubé 80 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n = 4 à 8 souriceaux par jour et par sexe.



### III.1.8 – Contribution des différents organes au catabolisme de l'ornithine

Etant donné les variations de l'activité OAT constatées pour chaque organe ou tissu, il nous a paru intéressant de rapporter l'activité OAT mesurée/mg de protéines au poids total de l'organe ou tissu pour évaluer la contribution de chaque organe ou tissu au catabolisme global de l'ornithine. Nous avons choisi, le stade 20 jours où les animaux n'ont pas encore subi les conséquences ni du sevrage, ni de la puberté, et le stade 45 jours qui correspond à un animal adulte.

Nous avons réalisé une estimation de l'activité OAT totale pour les 10 organes étudiés. Nous avons les données pondérales précises pour chaque organe et pour les tissus qui ont une répartition diffuse comme le tissu adipeux et le tissu musculaire nous avons ajusté leur masse avec les données de notre fournisseur d'animaux selon lesquelles à chaque âge correspond une masse musculaire ou adipeuse. Nous obtenons une activité OAT de 3445 nmol P5C / min chez les souris femelles adultes, et de seulement 2708 nmol P5C / min chez les souris mâles adultes. Chez les femelles, le foie est l'organe qui contribue le plus au catabolisme de l'ornithine (37% de la production de P5C), suivi de peu par les muscles et les reins dont la contribution s'élève respectivement à 30% et 22%. La contribution des autres organes est relativement faible (4,3 à 0,2%) (Fig. 41A).



**Figure 41 : Activité OAT totale dans les organes de souris mâles et femelles adultes et âgées de 20 jours.** Les activités ont été calculées dans les deux reins (R), le foie (F), les muscles (données déterminées à partir du gastrocnémien, du quadriceps et du *biceps surae*) (M), des poumons (P), du cœur (Co), du WAT (W), du BAT (B), des hémisphères (H), du cervelet (Ce) et du tronc cérébral (Tc). **A:** souris adultes, **B:** souris âgées de 20 jours. Bleu: mâle, Rose: femelles. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 6$  à 9 souris. Les différences statistiques ont été testées à l'aide du test U de Mann-Whitney. Mâle vs femelle: \*  $P < 0,05$  and \*\*  $P < 0,002$



Chez les souris mâles adultes, le foie et les muscles contribuent de façon équivalente au catabolisme totale de l'ornithine (39%). Les autres organes, y compris les reins participent peu à la production totale de P5C (10 à 0,3%) (Fig. 41A).

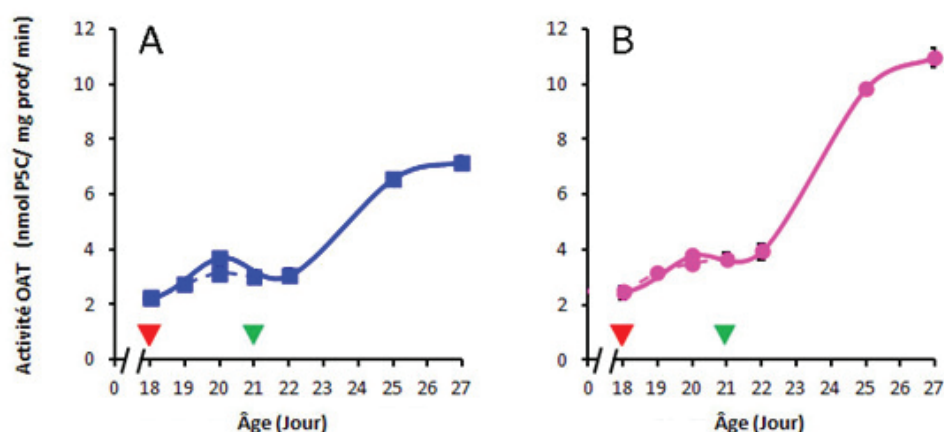
Au cours du développement postnatal (à l'âge de 20 jours) ce sont les muscles squelettiques dont l'activité OAT totale est la plus forte et représente 50% de la production globale de P5C. La contribution du foie et du rein (25% et 9% respectivement) est plus faible que chez l'adulte alors que celle des autres organes est quasiment nulle (Fig. 41B).

### **III.2 - Effet du sevrage précoce des souriceaux sur l'activité OAT hépatique et musculaire.**

Parmi les organes étudiés précédemment le foie et le muscle squelettique montrent une augmentation notable de l'activité OAT à J21, au moment du sevrage. Le sevrage consiste pour les souriceaux au passage d'une alimentation liquide de type lactée contenant environ 6-10% de protéines (Barnett & Dickson 1984; Johnson *et al.* 2001; Yajima *et al.* 2006) à une alimentation solide composée principalement de glucides (76%), de lipides (6%) et de protéines (18%). Nous avons donc mis en place un sevrage précoce à 18 jours pour une série de souriceaux mâles et femelles (6 par points de 18 à 27 jours), pour vérifier l'effet potentiel du changement d'apport protéique sur l'activité OAT du foie et de trois muscles squelettiques (quadriceps femoris, gastrocnémien et triceps brachial). Nous avons vérifié que les animaux étaient capables de se nourrir malgré la précocité du sevrage et que l'évolution de leur poids correspondait à ceux des animaux témoins.

#### **III.2.1 – Le foie**

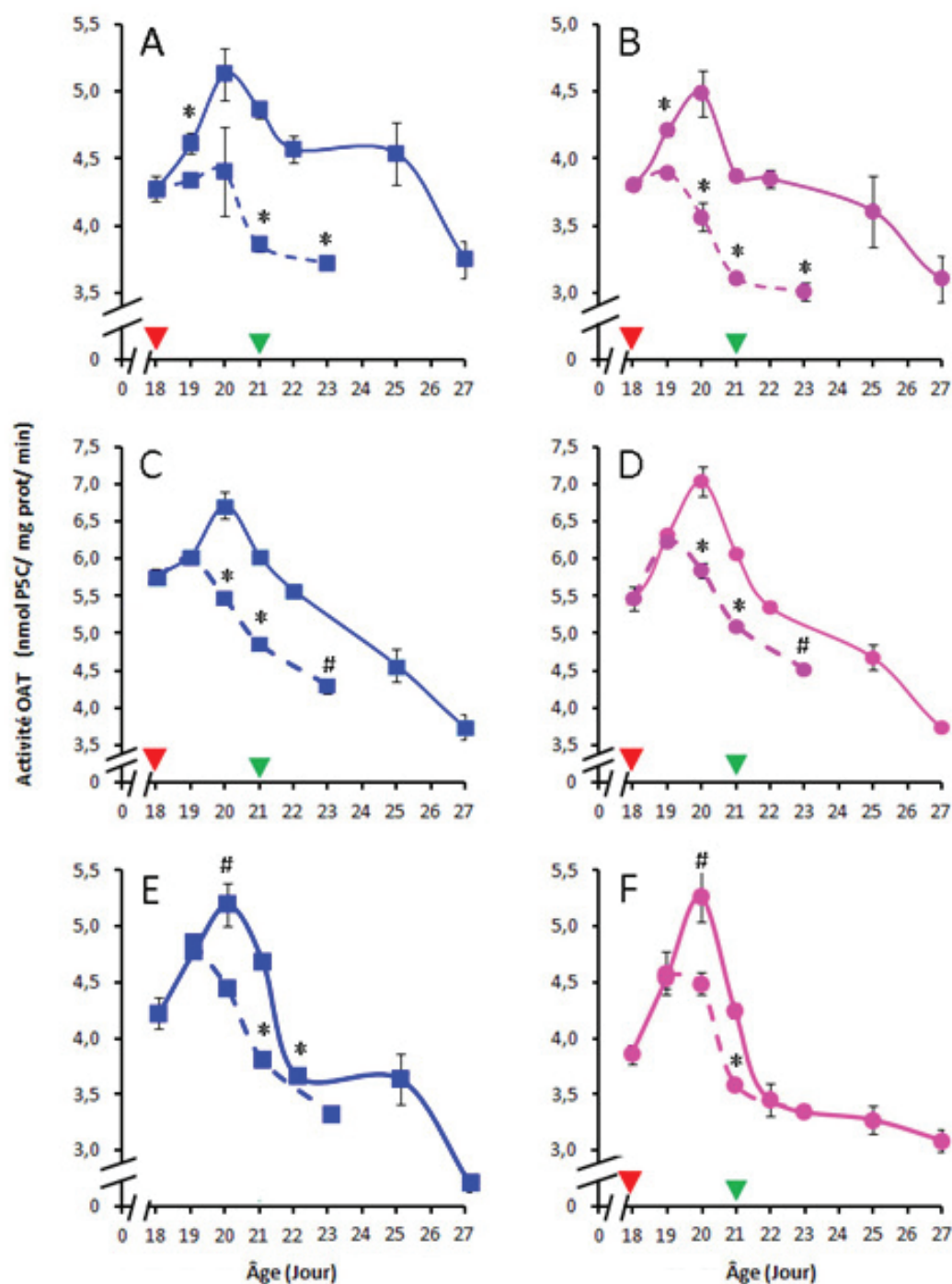
Le sevrage anticipé à 18 jours ne produit pas d'effet majeur sur l'activité OAT hépatique chez les souriceaux mâles et femelles (Fig. 42 A,B).



**Figure 42 : Effet du sevrage anticipé sur l'activité OAT hépatique des souris mâles et femelles au cours du développement postnatal. A: mâles, B: femelles, ligne pleine: souriceaux sevrés à 21 jours, ligne en pointillé: souriceaux sevrés de façon anticipée à 18 jours. Triangle vert: sevrage à 21 jours, triangle rouge: sevrage anticipé (18 jours). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM, n = 6.**

### III.2.2 – Le muscle squelettique

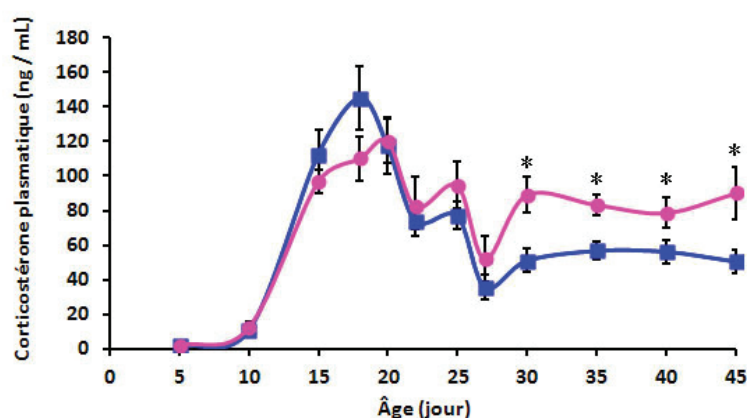
Contrairement à ce qui se passe dans le foie, l'activité OAT est fortement perturbée par un sevrage précoce dans les muscles squelettiques (Fig. 43). Le profil de perturbation est sensiblement identique pour les trois muscles étudiés. La courbe ascendante qui conduit au pic d'activité maximale à 20 jours chez les animaux témoins est interrompue au 19<sup>ème</sup> jour chez les animaux sevrés précocement. A partir de cette date et jusqu'à J23, l'activité OAT diminue progressivement et parallèlement à celle des animaux témoins, avec des valeurs toujours inférieures chez les animaux sevrés précocement (Fig.43). L'étape du sevrage et probablement l'augmentation de l'apport protéique provoquent donc une diminution rapide de l'activité OAT musculaire chez les mâles comme chez les femelles.



**Figure 43 : Effet du sevrage précoce sur l'activité OAT des muscles squelettiques de souris mâles et femelles au cours du développement postnatal.** Bleu : mâles, rose : femelles, A et B : quadriceps, C et D : gastrocnémien, E et F : triceps brachial, triangle vert : sevrage des animaux à 21 jours, triangle rouge : sevrage précoce des animaux à 18 jours. Les animaux ont été sacrifiés de 18 à 27 jours après leur naissance. Au moment du sevrage les animaux ont été séparés de la mère et ont disposé *ad libitum* d'eau du robinet et des biscuits secs (2018 Teklad Global, Harlan, Gannat, France). Les dosages de l'activité OAT ont été effectués à partir d'un volume de 200µL d'homogénat centrifugé et incubé 80 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n = 6 souriceaux par jour et par sexe. Test U de Mann-Whitney; sevrés J21 vs sevrés J18; # $P < 0,05$  ; \* $P < 0,001$ .

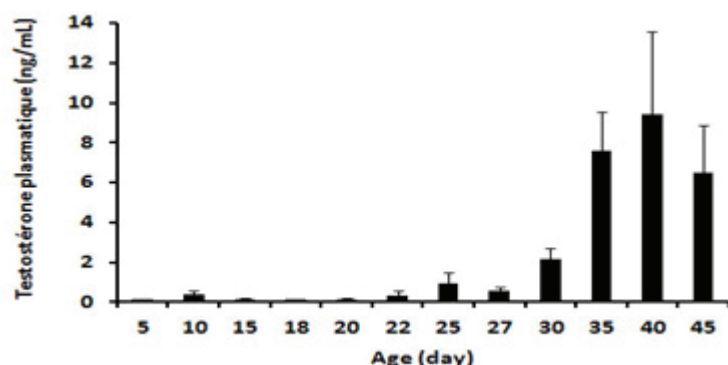
### III.3 – Effet hormonal – Concentration plasmatique de la corticostérone et de la testostérone pendant la période postnatale

Chez les souriceaux mâles et femelles âgés de 5 et 10 jours, la concentration plasmatique de **la corticostérone** est très faible ( $< 2$  ng / mL) et à la limite du seuil de détection de la technique utilisée dans cette étude (Fig. 44). A partir de J10, la concentration plasmatique augmente de manière importante et atteint un pic à J18. A partir de J18 cette concentration diminue de manière irrégulière jusqu'à J27 puis augmente légèrement avant de se stabiliser jusqu'à J45. Les valeurs mesurées chez les femelles sont constamment supérieures à celles des mâles [valeur moyenne pour les 4 dernières mesures (J30, 35, 40, 45) : 53 ng / mL pour les mâles et de 85 ng / mL pour les femelles] révélant l'existence d'un dimorphisme sexuelle de la concentration plasmatique en corticostérone en faveur des souris femelles (Mann-Whitney, mâles vs femelles,  $P < 0,05$ ), (Fig.44).



**Figure 44 : Concentration plasmatique en corticostérone des souriceaux mâles et femelles au cours du développement postnatal.** Bleu : mâles, rose : femelles. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 6$  à 13 souriceaux par jour et par sexe. Test U de Mann-Whitney, mâles vs femelles, \*  $P < 0,05$ .

La concentration plasmatique **en testostérone** est à peine détectable durant les 25 premiers jours de vie (Fig. 45). Elle augmente progressivement de J25 à J30, puis elle atteint un niveau maximal de concentration à partir de J35.

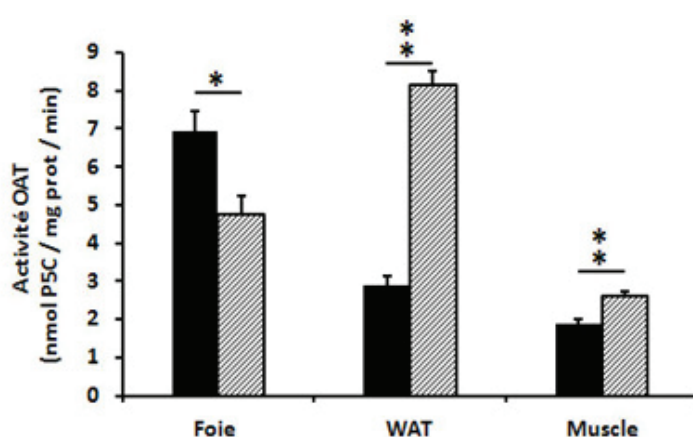


**Figure 45 : Concentration plasmatique en testostérone des souriceaux mâles au cours du développement postnatal.** Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 6$  à 13 souriceaux par jour.

### III.4 - Effet de la castration sur l'activité OAT

Pour vérifier l'effet des hormones sexuelles et en particulier l'effet de la testostérone sur l'activité OAT, un groupe de souris mâles a été orchidectomisé chirurgicalement et sacrifié 18 jours après l'opération, une période suffisante pour supprimer toute trace de testostérone plasmatique (Wichmann *et al.* 1996; Lin *et al.* 2010). L'orchidectomie réduit significativement l'activité OAT dans le foie (-31%, test t de Student, contrôles vs orchidectomisés,  $P < 0,008$ ), mais elle augmente notablement l'activité OAT dans le WAT (+182%,  $P < 0,0001$ ) et le muscle squelettique (+38%,  $P < 0,0001$ ) (Fig. 46). L'orchidectomie a donc des effets opposés sur l'activité OAT du foie par rapport à celle du muscle squelettique et du WAT. L'effet inhibiteur de la testostérone, déjà mis en évidence sur l'activité OAT rénale, est évident dans le muscle et surtout dans le WAT puisque les valeurs de l'activité OAT du WAT chez les animaux orchidectomisés sont similaires à celles mesurées chez les souriceaux avant la puberté.

A l'opposé, la testostérone aurait un effet stimulateur sur l'activité OAT du foie.



**Figure 46 : Effet de l'orchidectomie sur l'activité OAT du foie, du WAT et du muscle squelettique de souris mâles adultes.** Barres noires : mâles contrôles, barres hachurées : mâles castrés. Les souris ont été euthanasiées 18 jours après l'orchidectomie. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 8$  souris mâles. Les différences statistiques ont été testées à l'aide du test t de Student. Contrôles vs orchidectomisés : \*  $P < 0,008$  ; \*\*  $P < 0,0001$ .

## IV - Discussion

Cette étude décrit les variations de l'activité OAT au cours de la période postnatale qui s'étend de 1 à 45 jours chez la souris, confirme la mise en place du dimorphisme sexuel de cette activité dans le foie, le WAT, les muscles squelettiques et le poumon et montre pour la première fois, une régulation tissu-spécifique, liée à l'âge, au changement alimentaire du sevrage et à l'influence hormonale de l'orchidectomie.

En plus du rein, des intestins et du foie dont l'activité OAT est largement reconnue (*e.g.* Herzfeld & Knox 1968) nos résultats montrent que certains tissus comme le WAT ou les muscles

squelettiques ont pu être sous-estimés en ce qui concerne leur contribution dans le métabolisme global de l'ornithine. Par exemple, malgré la faible activité OAT détectée dans le muscle (par g de tissu ou de protéines), l'importance de sa masse conduit à une contribution globale de l'OAT musculaire au moins aussi importante que celle du foie chez la souris adulte. Cette contribution est encore plus marquée chez les souriceaux au cours de la croissance puisqu'à 20 jours, juste avant le sevrage, l'activité OAT musculaire représente 50% du catabolisme global de l'ornithine estimé sur 10 organes. Ce qui conduit à envisager que l'activité OAT tissulaire est régulée localement et en fonction des besoins de l'organisme.

Nous avons donc exploré l'ontogenèse de l'activité OAT dans le foie, les muscles squelettiques, le WAT, le BAT et le poumon chez des souriceaux mâles et femelles de la naissance à 45 jours. Nos résultats montrent que l'activité OAT varie pendant les premières semaines avant le sevrage et que les changements sont tissu-spécifiques, l'activité OAT étant augmentée jusqu'au sevrage dans le foie et le muscle squelettique et inchangée dans le WAT. Nous avons exclu le poumon de la suite de notre étude car contrairement aux autres organes dont l'activité OAT subit de grandes variations liées aux étapes cruciales du sevrage et de la puberté, le poumon présente une augmentation linéaire de son activité OAT. Cette augmentation régulière a le même profil que celui décrit au cours du développement postnatal pour la P5C-réductase (Herzfeld *et al.* 1977), ce qui suggère que l'activité conjointe de ces deux enzymes pourrait favoriser la synthèse de proline, élément indispensable à la synthèse de collagène et d'élastine. L'activité OAT pulmonaire aurait donc un rôle tout à fait particulier dans le développement et la maturation de l'appareil respiratoire des souriceaux.

Les changements observés dans le foie, les muscles et le WAT sont corrélés à l'évolution des taux plasmatiques de corticostérone qui pourrait avoir un rôle dans la régulation postnatale de l'activité OAT de ces organes. Les hormones thyroïdiennes pourraient aussi être impliquées dans cette régulation postnatale en raison i) de l'augmentation rapide du taux de 3,5,3'-triiodo-L-thyronine ( $T_3$ ) plasmatique à la naissance et qui atteint un maximum durant la deuxième semaine du développement postnatal de la souris (Hadj-Sahraoui *et al.* 2000) et ii) de l'action exercée par la  $T_3$  sur l'expression de l'OAT (Shull *et al.* 1995). De la même manière, les glucocorticoïdes semblent réguler précocement l'activité OAT hépatique, contrôle qui pourrait être potentialisé par la thyroxine (Vandewater & Hennin, 1985).

*Les hormones sexuelles et en particulier la testostérone influencent l'ontogenèse de l'activité OAT chez les souris mâles et femelles.*

Il est intéressant de noter qu'après le sevrage, entre la troisième et la quatrième semaine de vie, l'activité OAT subit de soudains et grands changements, elle augmente progressivement dans le foie et diminue dans le WAT et le muscle squelettique. Au cours de ces changements, un dimorphisme sexuel apparaît graduellement. En revanche, nous n'avons pas retrouvé le dimorphisme sexuel mis en évidence dans le BAT des souris adultes. Le cœur et le cerveau qui ne présentaient pas de dimorphisme sexuel, ont une activité OAT stable pendant toute la période postnatale.

Nos résultats démontrent pour la première fois des profils d'activité opposés dans le foie par comparaison avec le WAT et le muscle squelettique. Les changements de l'activité OAT hépatique observés chez les souris mâles et femelles au cours du développement postnatal ressemblent à ceux décrits chez le rat en croissance (Herzfeld & Knox 1968; Rähä & Kekomäki 1968; Herzfeld & Greengard 1969; Volpe *et al.* 1969). Les plus grands changements se produisent après le sevrage au cours d'une période critique du développement postnatal qui correspond au début de la sécrétion des hormones sexuelles (Drickamer 1975; Honma *et al.* 2002; Levillain *et al.* 2007; Wu *et al.* 2010). Les stéroïdes sexuels mâles et femelles sont connus pour réguler l'activité OAT, mais de façon opposée et de manière tissu spécifique. Le 17 $\beta$ -œstradiol régule positivement l'activité OAT rénale des rats durant le développement postnatal (Herzfeld & Knox 1968; Wu 1979; Mueckler & Pitot 1983) alors que la testostérone régule négativement l'activité OAT dans le rein de souris femelles (Manteuffel-Cymborowska *et al.* 1995; Levillain *et al.* 2005, Levillain *et al.* 2007). Les changements concomitants de l'activité de l'OAT et des concentrations plasmatiques de testostérone observées dans notre étude sont en faveur d'un rôle de la testostérone dans l'évolution ontogénique de l'activité OAT dans le foie, le WAT et le muscle des souris mâles. Pour vérifier le rôle potentiel de la testostérone sur les profils ontogéniques de l'OAT, nous avons mesuré les effets d'une orchidectomie sur l'activité OAT tissulaire. La suppression de la sécrétion de la testostérone par l'orchidectomie diminue l'activité OAT hépatique (-31%) mais augmente l'activité OAT dans le muscle squelettique (+31%) et le WAT (+180%). Les résultats observés dans le WAT et le muscle squelettique sont en accord avec les données sur le rein de souris montrant que la testostérone régule négativement l'activité OAT (Levillain *et al.* 2011). En revanche, nos résultats obtenus dans le foie de souris ne concordent pas avec ceux obtenus chez le rat qui montrent que



l'orchidectomie n'a aucun effet sur l'activité OAT du foie (Herzfeld & Knox 1968). Une étude précédente avait cependant déjà démontré que les mêmes facteurs de contrôle peuvent avoir des effets différents sur l'activité OAT du rat et de la souris (Bulfield & Hall 1981). Les androgènes (résultats de notre étude) et probablement les œstrogènes contribuent donc aux changements importants de l'activité OAT intervenant après le sevrage mais avec des effets opposés selon les tissus. De telles différences de régulation de l'activité OAT selon les tissus ne peuvent pas pour l'instant être reliées à l'existence éventuelle d'isoenzymes. Il a été montré que les OAT hépatique, rénale et intestinale ont des réponses divergentes à certains stimuli et pourtant, elles ont les mêmes caractéristiques physicochimiques et les mêmes propriétés cinétiques et immunochimiques (Sanada *et al.* 1970; Herzfeld & Raper 1976). De plus, les OAT hépatique et rénale possèdent les mêmes séquences moléculaires codantes (Kobayashi *et al.* 1989). Des protéines co-régulatrices, connues pour modifier l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux androgènes, de manière spécifique pour chaque tissu (Heinlein & Chang 2002), pourraient être impliquées dans les effets contrastés de la testostérone sur l'activité OAT. Il se pourrait aussi que d'autres facteurs non encore explorés soient aussi impliqués.

#### *Le sevrage influence l'ontogenèse précoce de l'activité OAT musculaire et hépatique chez les souris mâles et femelles*

Nos résultats mettent en évidence une diminution brutale de l'activité OAT détectée dans les muscles squelettiques avant la puberté et l'augmentation des taux plasmatiques de stéroïdes. Le changement de nourriture induit par le sevrage pourrait être impliqué dans cette diminution. Un sevrage anticipé de 3 jours (à J18 au lieu de J21) induit en effet une diminution anticipée de l'activité OAT musculaire. Ainsi, le passage d'une alimentation lactée riche en lipides (22%) et relativement pauvre en protéines (10%) (Meier *et al.* 1965; Yajima *et al.* 2006) à une alimentation sous forme de croquettes, riche en protéines (18%), module l'activité OAT musculaire. L'amorce de la diminution de l'activité OAT se produit en réalité entre le 20<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour chez les animaux sevrés normalement à 21 jours. Ce qui pourrait être relié à la présence systématique de croquettes dans l'estomac des souriceaux dès le 20<sup>ème</sup> jour. Le sevrage anticipé n'a pas d'effet sur l'activité OAT hépatique bien que celle-ci augmente régulièrement à partir du sevrage à 21 jours. Pourtant, la teneur en protéines de l'alimentation a déjà été évoquée dans la régulation de l'activité OAT hépatique. On peut toutefois remarquer que des enrichissements importants en protéines (de 5 à 70%, de 0 à 20% ou de 20 à 60%) étaient nécessaires pour induire une augmentation de l'activité OAT hépatique (Pitot & Peraino

1963; Brennan *et al.* 1970; Mueckler *et al.* 1983; Matsuzawa *et al.* 1994). Selon nos résultats, c'est donc le muscle qui apparaît le plus sensible au changement de nourriture pendant la croissance rapide des animaux. Néanmoins, l'augmentation du taux de protéines alimentaire pourrait contribuer, du moins en partie, à la diminution de l'activité OAT musculaire et à l'augmentation de l'activité OAT hépatique aussi bien chez les souriceaux mâles que femelles mais les bases moléculaires de ces effets aussi contrastés restent à explorer.

*Rôle physiologique de l'OAT dans le foie, le WAT et les muscles squelettiques au cours du développement postnatal.*

L'activité non négligeable de l'OAT dans le foie, le WAT et les muscles squelettiques au 20<sup>ème</sup> jour de développement nous a conduits à nous interroger sur son rôle physiologique. En dépit de son taux d'activité relativement faible pendant les 3 premières semaines postnatales, l'OAT hépatique pourrait contribuer à la synthèse de glutamate, laquelle couplée à la synthèse de glutamine pourrait éliminer l'ammoniaque non éliminé par le cycle de l'urée et fournir le glutamate nécessaire à la néoglucogenèse hépatique (Mallette *et al.* 1969), néoglucogenèse essentielle pour alimenter la croissance intense des souriceaux.

Dans les muscles squelettiques, l'augmentation graduelle de l'activité OAT peut aussi fournir les substrats énergétiques au fonctionnement mitochondrial pour assurer la mise en place de l'activité contractile. Cette activité OAT intense dans le muscle est cependant troublante si l'on considère qu'à ce stade l'arginine, le substrat des arginases qui alimente l'OAT en ornithine est limité. Le lait maternel est en effet peu riche en arginine et la synthèse endogène d'arginine insuffisante pour assurer les besoins nécessaires à une croissance maximale. (Vissek 1986, Reyes *et al.* 1994, Cynober & Coudray-Lucas 1995). Cela ne colle pas non plus avec la diminution brutale de l'activité OAT au moment du sevrage. Nous proposons donc l'hypothèse selon laquelle, dans le muscle squelettique, le flux généré par l'OAT soit dirigé dans le sens de la synthèse de l'ornithine plutôt que dans le sens de sa dégradation. Cette réaction requiert du glutamate et de la proline qui sont les acides aminés majeurs du lait de souris (Meier *et al.* 1965). Dans cette configuration, l'arginine serait économisée pour d'autres processus et l'ornithine produit servirait de substrat pour l'ornithine décarboxylase, enzyme initiatrice de la voie des polyamines, activateurs potentiels de la croissance et du développement (Lee & Maclean 2011). Après le sevrage, lorsque l'arginine n'est plus limitante, une forte activité OAT musculaire ne serait plus nécessaire. Cette hypothèse mériterait bien sûr d'autres investigations expérimentales.

*Notre deuxième étude démontre donc l'importance potentielle de l'OAT dans le développement postnatal des souris. L'activité de l'OAT est régulée de manière spécifique, dans chaque organe et tissu et pour chaque sexe, par plusieurs facteurs incluant les stéroïdes sexuels, la corticostérone et l'apport protéique de l'alimentation. Il semble que chaque organe adapte son activité OAT aux besoins des souriceaux durant cette période critique et que certains tissus comme le muscle squelettique pourraient contribuer de manière forte et inattendue au métabolisme général de l'ornithine.*

*Nous avons donc envisagé dans une troisième étude de mesurer les effets d'une contrainte métabolique sur l'activité OAT de quelques organes clefs chez des souris adultes. Le muscle ayant un rôle primordial dans la thermogénèse, il nous a paru intéressant de soumettre nos souris à un stress thermique et ceci d'autant plus que l'exposition au froid entraîne des modifications de l'homéostasie hormonale et des modifications de la prise alimentaire.*

## Etude 3 - Expression de l'ornithine aminotransférase au cours de l'exposition au froid chez la souris mâle

### I – Introduction

La souris est un endotherme, c'est-à-dire un organisme capable de maintenir sa température corporelle élevée et constante, indépendamment des variations de la température ambiante. Lors d'une exposition au froid, les endothermes mettent en place une thermogénèse de régulation qui repose d'abord sur une thermogénèse de frisson sollicitant les muscles squelettiques (Beaudry & McClelland 2010), puis, si l'exposition au froid se prolonge, sur une thermogénèse sans frisson (NST) principalement générée par le tissu adipeux brun (BAT) chez les petits mammifères (Cannon & Nedergaard 2004 ; Cannon & Nedergaard 2011). L'exposition au froid s'accompagne d'une prise alimentaire accrue (Klain *et al.* 1963 ; Anderson *et al.* 1969 ; Bing *et al.* 1998 ; Bauwens *et al.* 2011) qui vise à compenser l'augmentation de la dépense énergétique pour des besoins de thermorégulation. On observe classiquement au froid un accroissement du métabolisme des lipides (Himms-Hagen 1972 ; Rabi *et al.* 1977 ; Uchida 1979) et des glucides (Hellerstein *et al.* 1996 ; Croset *et al.* 2001 ; Mithieux 2001) pour alimenter les processus thermogènes en substrats énergétiques.

L'incidence d'une exposition au froid sur le métabolisme des protéines a été peu explorée. Quelques études anciennes ont mis en évidence que l'excrétion azotée était fortement accrue chez des rats exposés au froid avec une augmentation de l'excrétion d'urée, de créatine, de créatinine et d'acide urique (Mefferd *et al.* 1958 ; Klain *et al.* 1963). Il est également connu que le froid augmente l'oxydation des lipides et des glucides mais également des protéines (revue dans Chaffee & Roberts 1971). Plus récemment il a été montré chez le rat, que le tissu adipeux brun (BAT) dont l'activité thermogène est stimulée au froid, augmente son captage de glutamine, glutamate, alanine, leucine, isoleucine et thréonine et augmente sa libération de proline et de glycine (López-Soriano & Alemany 1987). Or, l'ornithine, *via* l'OAT, est le précurseur d'acides aminés (glutamate, glutamine, proline et  $\alpha$ -cétooglutarate) qui peuvent

intégrer la néoglucogénèse et permettre l'approvisionnement de l'organisme en substrats énergétiques (Mallette *et al.* 1969 ; Shiota *et al.* 1985 ; Shiota *et al.* 1995).

L'activation des processus métaboliques au froid repose sur l'augmentation de l'activité sympathique et la sécrétion de nombreuses hormones. Les modifications de l'homéostasie hormonale liées à l'exposition au froid ont été très peu étudiées chez la souris. Une étude montre cependant une diminution de la sécrétion de testostérone et une augmentation de la sécrétion des glucocorticoïdes chez des souris BALB/Clac et C57B5/6J exposées 5 semaines à une température de 6°C (Moshkin *et al.* 1993). Notre étude II ayant montré que la testostérone ainsi qu'une augmentation de la prise alimentaire modulent l'activité de l'OAT dans le WAT et les muscles squelettiques, il est fortement envisageable qu'une exposition au froid affecte le métabolisme de l'ornithine, du moins dans ces mêmes organes.

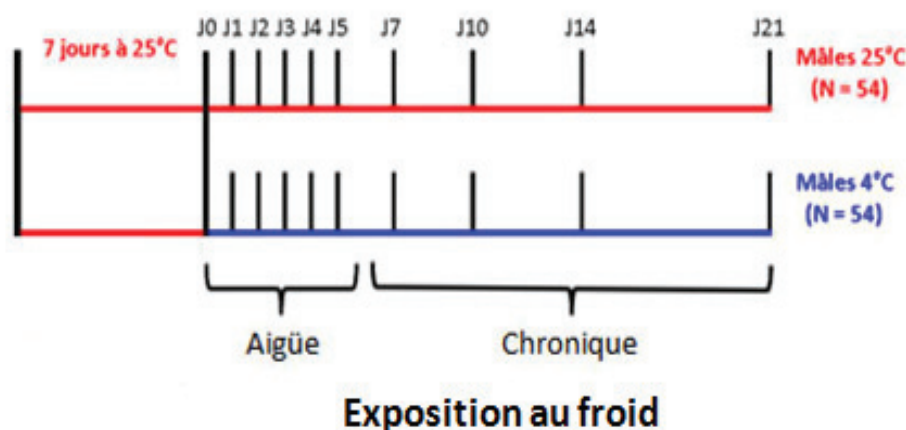
Il nous a donc paru important d'étudier les effets de l'exposition au froid sur l'activité OAT dans les organes impliqués soit dans la production de chaleur (muscles squelettiques, BAT), soit dans la gestion des réserves énergétiques et la production de substrats énergétiques (foie, rein, WAT), soit dans le cerveau, chef d'orchestre de la mise en place des mécanismes thermorégulateurs au froid. Pour s'affranchir du dimorphisme sexuel de l'activité OAT existant dans de nombreux tissus notamment dans le foie, le muscle squelettique, le tissu adipeux blanc, notre étude ne concerne que des souris mâles adultes.

## **II. Matériels et méthodes spécifiques de l'étude**

### **II.1 - Animaux et conditions d'hébergement**

#### **II.1.1 – Animaux et protocole expérimental**

Les expérimentations ont été réalisées à partir de 108 souris Swiss mâles adultes (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France). Les animaux ont été placés dès leur réception et pendant une semaine dans une pièce dont la température a été maintenue à 25°C pour qu'ils s'acclimatent à leur nouvel environnement et éliminent le stress occasionné par le transport. Pour étudier les conséquences physiologiques et biochimiques de l'acclimatation au froid, les 108 animaux ont été répartis de manière aléatoire en deux groupes de 54 animaux selon le protocole expérimental décrit dans la figure 47.



**Figure 47 : Protocole expérimental.** Chaque souris a été individualisée dans une cage de dimensions 25x15x13 cm. Après une semaine de stabulation à 25°C, 54 souris ont été installées dans une pièce dont la température a été maintenue à 4°C. 54 souris sont restées dans le box à 25°C. Chaque lot de 54 souris a été subdivisé en 9 groupes de 6 individus. Chacun des groupes a été maintenus 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14 ou 21 jours consécutifs soit à 4°C soit à 25 °C.

Ce protocole expérimental a été validé par le Comité Régional d’Ethique pour l’Expérimentation Animale (CREEA) du CNRS (n°0293). Les expériences se sont déroulées dans une animalerie déclarée et enregistrée apte à l’hébergement et aux manipulations sur les animaux vertébrés auprès de la Direction Départementale de la Protection des Populations (DDPP), sous le numéro d’agrément 69 266 0602.

### II.1.2 - Hébergement et alimentation

L’animalerie a fonctionné sur un cycle de 12 heures de lumière et 12 heures d’obscurité avec un début d’éclairage à 06h00.

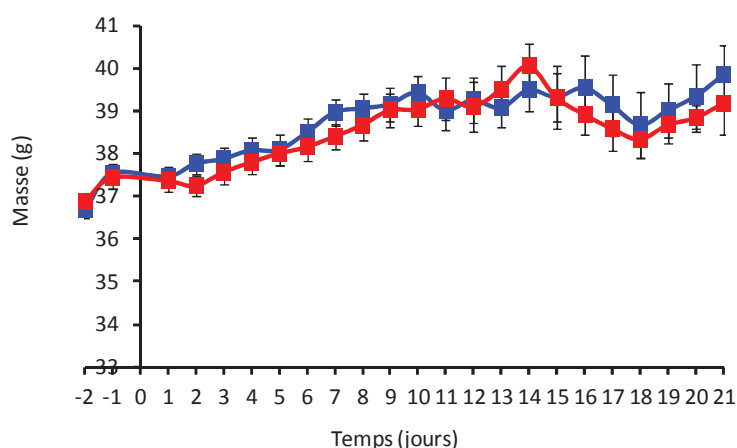
Les animaux ont disposé *ad libitum* de boisson (eau du robinet) et d’aliments présentés sous la forme de croquettes (2018 Teklad Global, Harlan, Gannat, France). Les croquettes sont majoritairement composées de protéines (18%), de lipides (6%) et de glucides (76%). En raison du système de refroidissement des box froids, le taux d’humidité y est plus important. Cette humidité entraîne une augmentation du poids des croquettes de  $8,2 \pm 0,2$  % (moyenne calculée sur 4 paquets de 180 à 200g) en 7 jours, puis leur poids reste stable. Nous y avons donc placé les aliments destinés aux animaux du box froid 7 jours avant leur distribution et nous avons tenu compte de cette augmentation de poids pour calculer la quantité de protéines ingérées.

La température des pièces maintenues à 25°C et à 4°C a été contrôlée et enregistrée toutes les 30 minutes à l'aide de sondes de température (174 Logger Testo, VWR, France). La moyenne des températures quotidiennes a été de  $25,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$  et de  $3,8 \pm 0,4^\circ\text{C}$ .

## II.2 - Suivi de l'évolution pondérale des animaux et des aliments ingérés.

### II.2.2 - Suivi de l'évolution pondérale des animaux

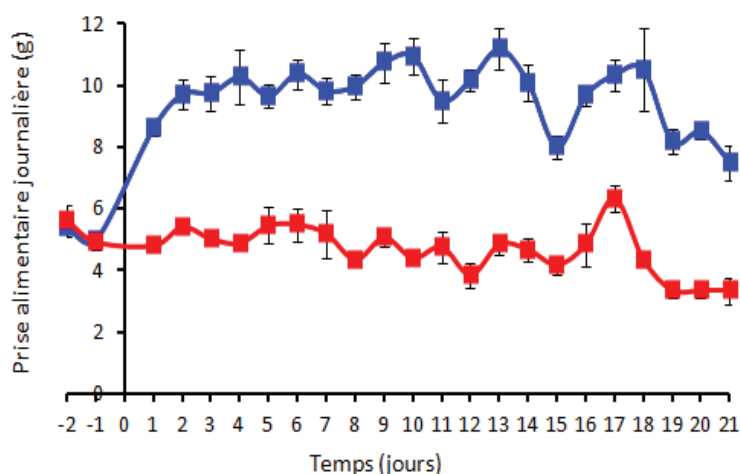
Les souris avaient quasiment toutes le même poids à leur arrivée. Quelle que soit la température d'hébergement, la masse corporelle des souris mâles a augmenté progressivement jusqu'à J10, puis s'est stabilisée à  $39,7 \pm 0,7$  g pour les mâles hébergés à 4°C et  $39,8 \pm 0,7$  g pour les mâles hébergés à 25°C (Fig. 48).



**Figure 48 : Variation de la masse corporelle moyenne des souris mâles hébergées à 4°C ou 25°C au moment du sacrifice.** Bleu : animaux à 4°C, rouge : animaux à 25°C. Moyenne  $\pm$  SEM; n = 54 à 6 (pesées de 1 à 21

### II.2.3 – Evolution de la prise alimentaire

Pour les souris hébergées à 25°C, la consommation d'aliments a été constante au cours de



l'expérimentation. Elle est de  $4,5 \pm 0,2$  g/ jour, ce qui représente un apport journalier en protéines de 0,82 g (Fig. 49).

**Figure 49 : Variation quotidienne de la prise alimentaire en fonction du temps d'exposition à 4°C ou 25°C.** Bleu : souris hébergées à 4°C, rouge : souris hébergées à 25°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n = 6 à 54 animaux.



Dès le premier jour d'exposition au froid, les animaux ont augmenté leur prise alimentaire, puis celle-ci s'est stabilisée au bout de 2 jours. La consommation moyenne des mâles hébergés à 4°C est de  $9,7 \pm 0,2$  g/jour, ce qui représente une augmentation de la prise alimentaire de 113% par comparaison avec celle des animaux témoins maintenus à 25°C (Fig. 49). Si l'on tient compte de l'augmentation de 8,2% de la masse des aliments constatée dans le box froid, la consommation protéique quotidienne réelle des souris hébergées à 4°C est de 1,6 g, soit une augmentation réelle de 95% par comparaison avec les animaux maintenus à 25°C.

### **II.3 - Anesthésie et prélèvement des organes**

Les souris ont été anesthésiées comme indiqué dans le chapitre « Matériels et méthodes » général et les organes suivant ont été prélevés comme décrit précédemment : les reins, le foie, le WAT, le BAT, le muscle gastrocnémien et le cerveau dans sa globalité. Les organes ont été immédiatement congelés dans de l'azote liquide et ont été stockés à -80°C.

Un morceau de foie destiné à l'extraction des mitochondries a été rincé et stocké dans du NaCl 0,9% préalablement refroidi à 4°C.

### **II.4 - Dosage de l'activité ornithine aminotransférase**

#### **II.4.1 - Mesure de l'activité OAT dans les organes**

Les organes ont été préparés comme décrit dans le chapitre « Matériels et méthodes » général et l'activité OAT a été dosée comme décrit précédemment.

#### **II.4.2 - Mesure de l'activité OAT hépatique, mitochondriale (mOAT) et cytosolique (cOAT)**

Les mitochondries et la fraction cytosolique hépatique ont été isolées par centrifugation différentielle selon la technique décrite dans le chapitre « Matériels et méthodes » général. Un volume de 50 µL de surnageant ou de 50 µL de fraction cytosolique a été incubé 60 minutes à 37°C à l'abri de la lumière, en présence ou non de 10 µL de gabaculine (10 mM).

### **II.5 - Dosage des protéines**

La concentration des protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (1976). La gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA, 1 mg/mL). Chaque

échantillon a été dosé en double et l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 595nm (UV 1800, Shimadzu).

## **II.6 – Mise au point des conditions de mesures des paramètres cinétiques de l'activité OAT hépatique**

Des morceaux de foie de 2 souris hébergées 7, 10, 14 ou 21 jours à 4°C ou à 25°C ont été poolés. Les 8 pools ainsi obtenus ont été homogénéisés comme décrit précédemment. Afin de travailler avec une enzyme la plus pure possible, les homogénats de foie ont été centrifugés 1h10 à 220 000g à 4°C à l'aide d'une ultra-centrifugeuse Beckman. Pour déterminer les vitesses de réactions initiales, un volume de 50 µL d'enzyme partiellement purifiée a été incubé 60 minutes en présence de concentrations croissantes d'un des deux substrats et d'une concentration fixe du second substrat de l'OAT. Ainsi, l'enzyme partiellement purifiée a été incubée en présence de 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ; 15 et 20 mM final d'ornithine, avec une concentration constante d'α-cétoglutarate (3,75 mM final), pour déterminer les paramètres cinétiques de l'OAT pour l'ornithine, ou bien en présence de 0,09 ; 0,14 ; 0,18 ; 0,32 ; 0,46 ; 0,93 ; 1,40 ; 1,87 ; 2,81 ou 3,75 mM final d'α-cétoglutarate, avec une concentration fixe d'ornithine (20 mM final), pour déterminer les paramètres cinétiques de l'OAT pour l'α-cétoglutarate. Les paramètres cinétiques de l'OAT ont été déterminés à l'aide de la représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden décrite dans le chapitre « Matériels et méthodes » général.

## **II.7 – Etude de l'expression de l'OAT hépatique par PCR quantitative (qPCR)**

L'expression de l'*Oat* hépatique au cours de l'exposition au froid a été étudiée par qPCR Taqman© comme décrit dans le chapitre « Matériels et méthodes » général.

## **II.8 - Mesure de la concentration tissulaire en polyamines**

Les concentrations tissulaires en putrescine, spermine et spermidine ont été déterminées dans le BAT des souris mâles témoins et soumises à un stress thermique de 4°C. Brièvement, un échantillon de BAT a été homogénéisé par ultrasons dans une solution d'acide perchlorique 0,2N. L'homogénat a été centrifugé 10 minutes à 3000 rpm, le surnageant a été prélevé et

stocké à -80°C. Le dosage de la concentration tissulaire en putrescine, spermine et spermidine a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre de masse LC/MS et les données ont été analysées avec le logiciel Chem Station 1100 (Agilent Technologies, Massy-Palaiseau, France) selon la technique décrite par Gaboriau *et al.* 2003.

## **II.9 - Calculs et statistiques**

La masse relative du BAT, du cœur et des reins est exprimée en mg d'organe par g de masse corporelle (mg/ g MC). Ce calcul permet, pour un organe donné, de comparer les masses quels que soient la température de la pièce d'hébergement (4°C ou 25°C) et le point de la cinétique de l'étude (J1 à J21).

L'activité OAT a été exprimée en nmol P5C/ mg de protéines solubles / minutes (nmol P5C/mg prot/min) et les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide des tests de Shapiro, F d'égalité des variances, de Kruskal-Wallis et U de Mann-Whitney.

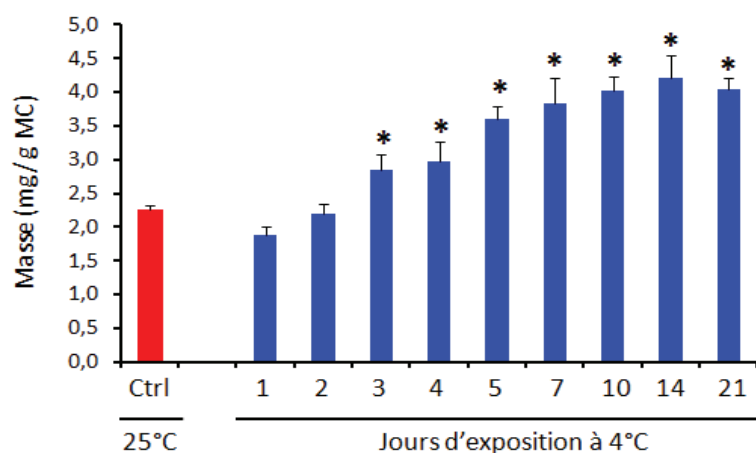
## **III. Résultats**

### **III.1 - Données pondérales**

Aucune différence significative n'a été observée entre la masse corporelle des animaux témoins et celle des animaux exposés au froid (4°C) pendant une période de 1 à 21 jours. Nous avons donc envisagé d'analyser l'évolution pondérale des organes et tissus qui sont de bons indicateurs de la mise en place de la thermogenèse : le BAT (thermogenèse sans frisson) et le WAT (lipogenèse/lipolyse).

#### **III.1.1 – Evolution de la masse du tissu adipeux brun (BAT)**

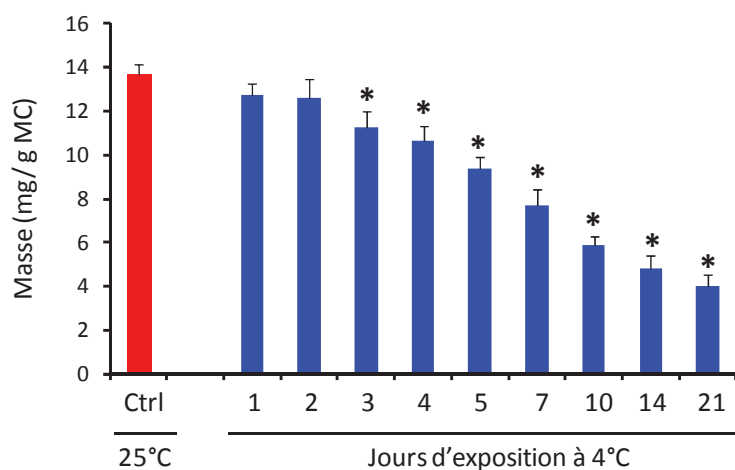
La masse relative du BAT des souris hébergées à 25°C restant stable au cours des 21 jours de l'expérimentation ( $2,25 \pm 0,8$ mg / g MC), cette valeur constitue notre référence. La masse relative du BAT des souris hébergées à 4°C augmente progressivement dès les premiers jours de l'exposition au froid, jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour. La masse relative moyenne du BAT atteint  $4,1 \pm 0,1$  mg/g MC, ce qui représente 70% d'augmentation par rapport aux souris témoins (Fig. 50).



**Figure 50 : Variation de la masse relative du tissu adipeux brun (BAT) des souris mâles adultes en fonction de leur temps d'hébergement à 4°C ou à 25°C.** Rouge : témoins, valeur moyenne de la masse du BAT des souris hébergées de 1 à 21 jours à 25°C. Bleu : 4°C, Moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 6$  pour chaque point de la cinétique. La masse relative est exprimée en mg/g de masse corporelle. Test U de Mann-Whitney ; \* $P \leq 0.025$  ; 4°C vs 25°C.

### III.1.2 – Evolution de la masse du tissu adipeux blanc (WAT)

La masse relative moyenne du WAT des souris témoins est de  $13,7 \pm 1,3$  mg/g MC (Fig. 51). Comme attendu, la masse relative du WAT des souris exposées au froid diminue d'un facteur 3,2. Cette diminution de la masse relative du WAT n'est cependant statistiquement significative qu'à partir du 5<sup>ème</sup> jour d'exposition au froid pour les souris (Fig. 51).



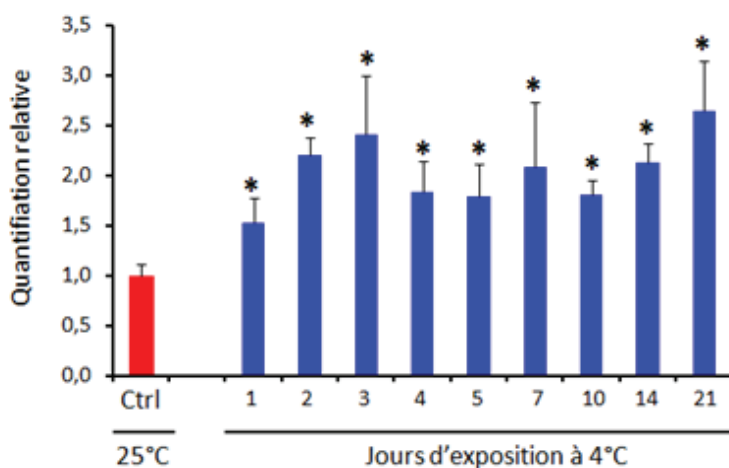
**Figure 51 : Variation de la masse relative moyenne du WAT des souris mâles adultes en fonction de leur temps d'hébergement à 4°C ou à 25°C.** Rouge : témoins, valeur moyenne de la masse du WAT des souris hébergées de 1 à 21 jours à 25°C. Bleu : 4°C, Moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . Les résultats sont exprimés en mg/g de masse corporelle. Test U de Mann-Whitney ; \* $P < 0.03$  ; 4°C vs 25°C.

## III.2 - Effets de l'acclimatation au froid sur l'OAT hépatique chez les souris mâles

### III.2.1 - Effet de l'acclimatation au froid sur l'expression des ARNm codant pour l'Oat.

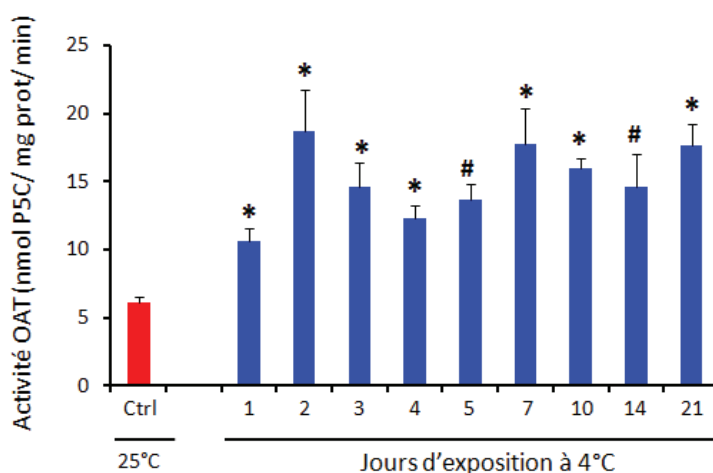
L'expression de l'Oat hépatique a été quantifiée par qPCR chez les souris hébergées à 25°C ou à 4°C (Fig. 52). Aucune variation de cette expression n'ayant été observée chez les animaux maintenus à 25°C, nous avons utilisé la valeur relative moyenne en unité arbitraire ( $1 \pm 0,2$ )

comme valeur de référence (Fig. 53). L'expression de l'*Oat* hépatique des souris exposées au froid varie de façon biphasique. Elle augmente brutalement dès le premier jour d'exposition pour atteindre un premier pic d'expression à J3 largement significatif. Elle diminue ensuite à partir de J4 et fluctue légèrement jusqu'à J14 puis augmente à nouveau pour atteindre une valeur 2,5 fois plus importante que celle des témoins (Fig. 52).



**Figure 52 : Variations de l'expression de l'*Oat* hépatique, mesurée par qPCR Taqman®, au cours de l'exposition au froid des souris adultes mâles.** Rouge : témoins, valeur relative moyenne de l'expression de l'*Oat* hépatique chez les souris hébergées de 1 à 21 jours à 25°C ; Bleu : à 4°C. Le niveau d'expression de l'*Oat* est exprimé par rapport au niveau d'expression de l'HPRT murine (Hypoxanthine-guanine phospho-ribosyltransférase) qui sert de gène de référence.

### III.2.2 - Effets de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT hépatique



**Figure 53 : Variation de l'activité OAT hépatique chez les souris adultes mâles en fonction de leur temps d'hébergement à 4°C ou à 25°C.** Rouge : Témoins, valeur relative moyenne de l'activité OAT hépatique chez les souris hébergées de 1 à 21 jours à 25°C ; Bleu : à 4°C. Les dosages ont été effectués à partir d'un volume de 50 µL de surnageant incubé 30 minutes à 37°C. Moyenne ± SEM, n = 6. Les résultats sont exprimés en nmol P5C / mg prot / min. Test U de Mann-Whitney ; # $P \leq 0,0163$  ; \* $P \leq 0.0065$  ; 4°C vs 25°C.

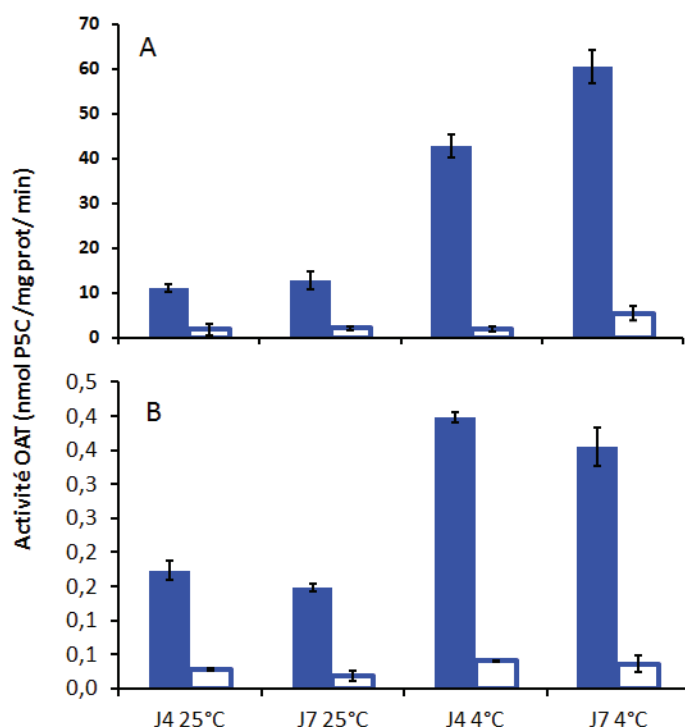
A 25°C, l'activité OAT hépatique des souris mâles et femelles reste stable tout au long des 21 jours de l'expérimentation, ce qui se traduit par une valeur moyenne de référence de  $6,16 \pm 0,32$  nmol P5C/mg prot/min (Fig. 53). Chez les souris exposées à 4°C, le profil de l'activité de l'OAT se calque sur celui de l'expression de son gène. L'augmentation est rapide puisque l'activité est doublée dès le premier jour, triplée le deuxième jour (166% d'augmentation par rapport à la valeur témoin des souris

maintenues à 25°C), puis diminue jusqu'à J4. Elle augmente à nouveau jusqu'à j7 et se maintient élevée jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour de l'exposition au froid (Fig. 53).

### III.2.3 - Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT mitochondriale (mOAT) et cytosolique (cOAT) hépatique

L'activité OAT a été mesurée sur les fractions mitochondriales et cytosoliques du tissu hépatique pendant la phase aigüe de l'acclimatation au froid (J1 à J7) qui correspond à l'augmentation brutale de l'activité OAT mesurée dans le tissu entier.

Par rapport aux animaux témoins dont l'activité mOAT ou cOAT reste stable, les animaux exposés à 4°C montrent une augmentation significative de leur activité OAT hépatique qu'elle soit mitochondriale ou cytosolique (Fig. 54). Il faut noter cependant que l'activité cOAT est 64 à 170 fois plus faible que l'activité mOAT (Fig. 54). Dès le 4<sup>ème</sup> jour d'exposition au froid, l'activité mOAT est augmentée de 286% et de 376% à 7 jours (Test U de Mann-Whitney ;  $P \leq 0,0495$  ; J4 ou J7, 4°C vs J4 ou J7, 25°C). L'ajout de 100  $\mu$ M de gabaculine inhibe à 99,9% l'activité mOAT et cOAT des animaux maintenus à 4°C ou à 25°C (Fig. 54).



**Figure 54 : Effet de l'acclimatation aigüe au froid sur l'activité OAT mitochondriale (mOAT) et cytosolique (cOAT) hépatique des souris mâles adultes.** A : mOAT, B : cOAT. Barre pleine : activité OAT ; barre vide : activité OAT + gabaculine. Les dosages de l'activité OAT ont été effectués à partir d'un volume de 50  $\mu$ L d'échantillon, incubé 60 min à 37°C en présence ou non de 100  $\mu$ M de gabaculine. Moyenne  $\pm$  SEM ; n = 3 à 4.

### III.2.4 - Effet de l'acclimatation au froid sur les paramètres cinétiques de l'OAT hépatique

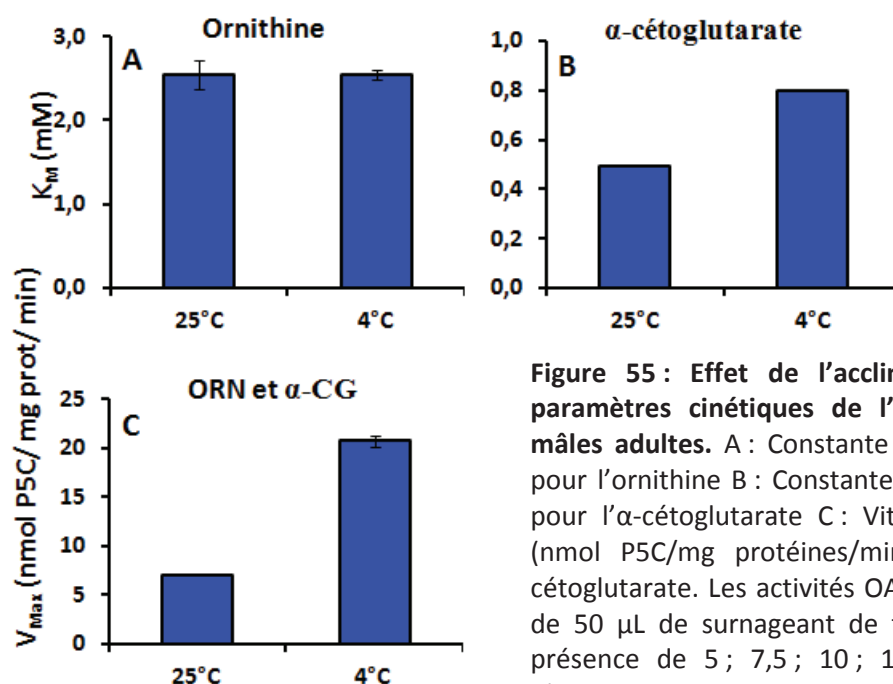


Figure 55 : Effet de l'acclimatation au froid sur les paramètres cinétiques de l'OAT hépatique des souris mâles adultes. A : Constante de Michaelis-Menten (mM) pour l'ornithine B : Constante de Michaelis-Menten (mM) pour l' $\alpha$ -cétoglutarate C : Vitesse maximale de réaction (nmol P5C/mg protéines/min) pour l'ornithine et l' $\alpha$ -cétoglutarate. Les activités OAT ont été mesurées à partir de 50  $\mu$ L de surnageant de foie incubés 60 minutes en présence de 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ; 15 et 20 mM finaux d'ornithine avec une concentration constante d' $\alpha$ -cétoglutarate (3,75 mM finaux), ou en présence de 0,09 ; 0,14 ; 0,18 ; 0,32 ; 0,46 ; 0,93 ; 1,40 ; 1,87 ; 2,81 ou 3,75 mM finaux d' $\alpha$ -cétoglutarate avec une concentration constante d'ornithine (20 mM finaux). Les paramètres cinétiques ont été déterminés par la représentation d'Eisenthal Cornish-Bowden. n = 3 expériences.

L'exposition au froid augmente fortement l'activité OAT hépatique. Nous avons vérifié si cette augmentation s'accompagne de modifications des paramètres cinétiques de l'enzyme, en déterminant son affinité pour l'ornithine et l' $\alpha$ -cétoglutarate ainsi que sa vitesse maximale de réaction (Fig. 55).

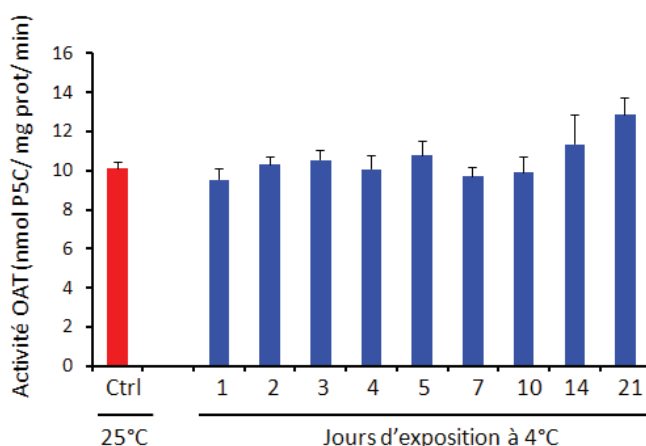
Si l'affinité de l'OAT pour l'ornithine ne change pas chez les animaux soumis à 4°C (Fig. 55A), l'affinité pour l' $\alpha$ -cétoglutarate est en revanche fortement diminuée par l'exposition au froid [60% comparativement à celle des souris témoins (Test U de Mann-Whitney ;  $P = 0,0495$  ; 4°C vs 25°C) (Fig. 55B). De plus, l'exposition à 4°C augmente de 185% la vitesse maximale de réaction de l'OAT hépatique (Test U de Mann-Whitney ;  $P = 0,0495$  ; 4°C vs 25°C) (Fig. 55C).

### III.3 - Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT rénale

L'activité OAT rénale réagissant classiquement à toute modification métabolique et notamment à tout changement de l'apport azoté, nous avons mesuré les effets de l'augmentation de la

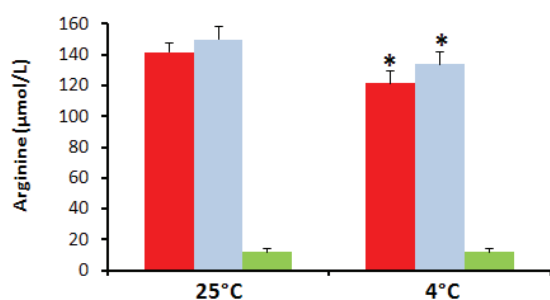


prise alimentaire occasionnée par l'exposition au froid chez les souris mâles adultes. Malgré quelques variations, nous n'observons pas de modification significative de l'activité OAT rénale chez les mâles maintenus à 4°C par rapport aux mâles témoins (Fig. 56).



**Figure 56 : Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT rénal des souris mâles adultes.** Rouge : témoins, valeur relative moyenne de l'activité OAT rénale chez les souris hébergées de 1 à 21 jours à 25°C ; Bleu : à 4°C. Les dosages de l'activité OAT ont été réalisés à partir d'un volume de 50 µL de surnageant, incubé 60 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n=6. Test U de Mann-Whitney ;  $P < 0,0339$  ; 4°C 25°C.

Devant cette absence de modification de l'activité OAT, nous avons vérifié la disponibilité en arginine qui peut potentiellement être un facteur limitant pour l'enzyme. La concentration plasmatique d'arginine diminue légèrement (environ 20%) chez les animaux exposés 4 jours à 4°C comparativement à celle des animaux maintenus à 25°C. La concentration efférente diminuant également il en résulte une différence artério-veineuse non modifiée par le froid (Fig. 57).



**Figure 57 : Concentration plasmatique de l'arginine dans la veine rénale et l'aorte des souris mâles acclimatées ou non au froid.** Les souris ont été maintenues à 25°C ou 4°C pendant 4 jours. Barre rouge: plasma du sang artériel, barre bleue: plasma de la veine rénale, barre verte: différence artério-veineuse. Moyenne  $\pm$  SEM, n = 6. Test U de Mann-Whitney, 4°C vs 25°C, \*  $P < 0,005$ .

La production rénale d'arginine reste donc inchangée au niveau de l'organe ce qui conforte une activité OAT rénale stable malgré le stress thermique.

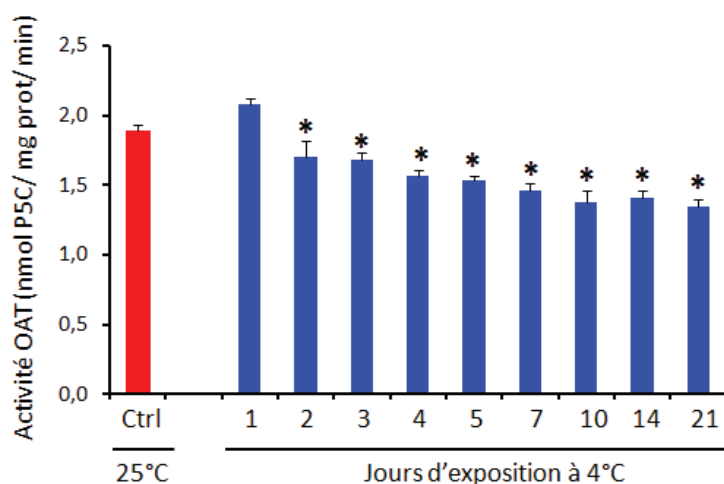
### III.4 - Effets de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT dans les tissus adipeux

#### III.4.1 - Le tissu adipeux brun (BAT)

L'exposition au froid produit classiquement une hyperplasie rapide du BAT et des modifications de ses caractéristiques fonctionnelles, notamment une biogenèse mitochondriale qui pourrait s'accompagner d'une modification de l'activité OAT.

##### III.4.1.1 - Modifications de l'activité OAT

L'activité OAT mesurée dans le BAT des souris hébergées à 25°C reste stable tout au long des 21 jours de l'expérimentation (valeurs moyennes :  $1,9 \pm 0,1$  nmol P5C/mg prot/min) (Fig. 58). A 4°C, l'activité OAT diminue progressivement pendant les premiers jours d'exposition au froid puis se stabilise à partir de J7 à une valeur moyenne de  $1,4 \pm 0,1$  nmol P5C/mg prot/min, ce qui représente une diminution d'activité de 26% par rapport aux animaux témoins. Cette diminution est significative dès 4 jours d'exposition au froid (Test U de Mann-Whitney ;  $P < 0,04$  ; 4°C vs 25°C) (Fig. 58).

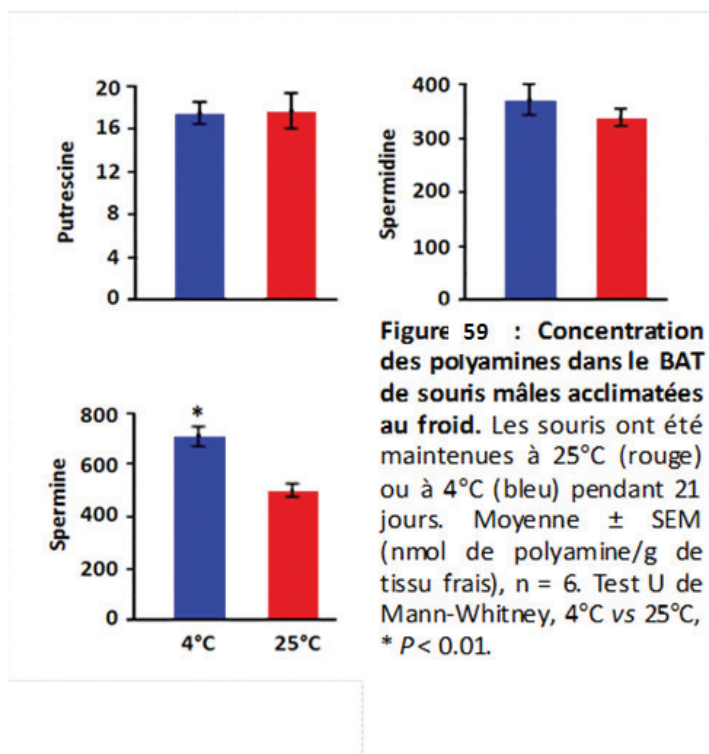


**Figure 58 : Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT du BAT des souris mâles adultes.** Rouge : témoins, valeur relative moyenne de l'activité OAT mesurée dans le BAT des souris hébergées de 1 à 21 jours à 25°C ; Bleu : à 4°C. Les activités OAT ont été mesurées à partir d'un volume de 150 µL de surnageant, incubé 90 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 6$ . Les résultats sont exprimés en nmol P5C / mg prot/min. Test U de Mann-Whitney ; \* $P < 0,04$  ; # $P < 0,0001$  ; 4°C vs 25°C.

##### III.4.1.2 – Variations des concentrations en polyamines dans le BAT

La diminution de l'activité OAT observée dans le BAT chez tous les animaux soumis au stress thermique étant inattendue, nous avons testé une hypothétique compétition entre la voie de l'OAT et la voie des polyamines qui pourrait être activée pour assurer la croissance tissulaire.

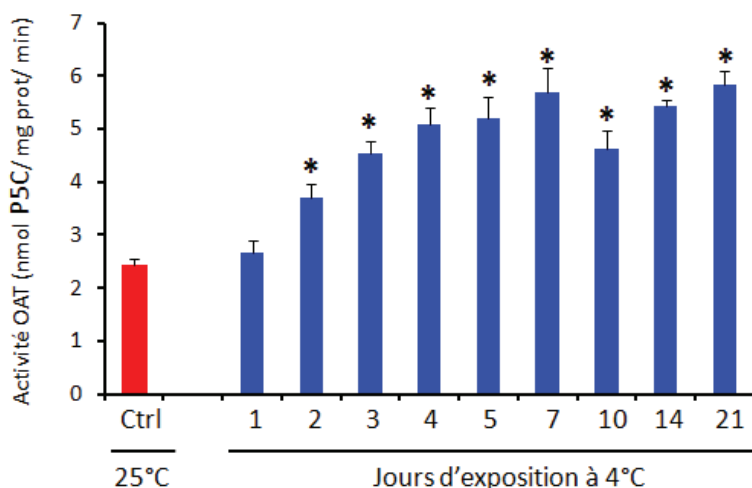
Les concentrations en polyamines dans le BAT des souris maintenues à 25°C sont de  $17 \pm 2$



nmol putrescine/g BAT frais,  $344 \pm 24$  nmol spermidine/g BAT frais et de  $506 \pm 32$  nmol spermine/g BAT frais (Fig. 59). Une exposition de 21 jours à 4°C n'a aucun effet sur la concentration tissulaire en putrescine et en spermidine. En revanche, l'acclimation au froid entraîne une augmentation significative de 38% de la concentration en spermine du BAT (Mann-Whitney, 4°C vs 25°C,  $P < 0.01$ ) (Fig. 59).

### III.4.2 - Le tissu adipeux blanc (WAT)

En tant que tissu de réserve, le tissu adipeux blanc subit classiquement d'importantes modifications lors d'une exposition au froid, nous en avons mesuré les effets sur son activité OAT.



**Figure 60 : Effet de l'acclimation au froid sur l'activité OAT du WAT des souris mâles adultes.** Rouge : Témoins, valeur relative moyenne de l'activité OAT mesurée dans le WAT des souris hébergées de 1 à 21 jours à 25°C ; Bleu : à 4°C. Les dosages de l'activité OAT ont été réalisés à partir d'un volume de 200  $\mu$ L de surnageant, incubé 60 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n = 6 Test U de Mann-Whitney ; #  $P < 0,045$  ; \*  $P \leq 0,0065$  ; 4°C vs 25°C.

L'activité OAT du WAT reste stable tout au long des 21 jours de l'expérimentation chez les animaux hébergés à 25°C [valeur moyenne :  $2,4 \pm 0,1$  nmol P5C/mg prot/min] (Fig. 60). Lors de l'exposition au froid, cette activité augmente progressivement pendant les 7 premiers jours puis se stabilise à une valeur moyenne de  $5,3 \pm 0,1$  nmol P5C/mg prot/min jusqu'à J21. Ce qui correspond à une augmentation

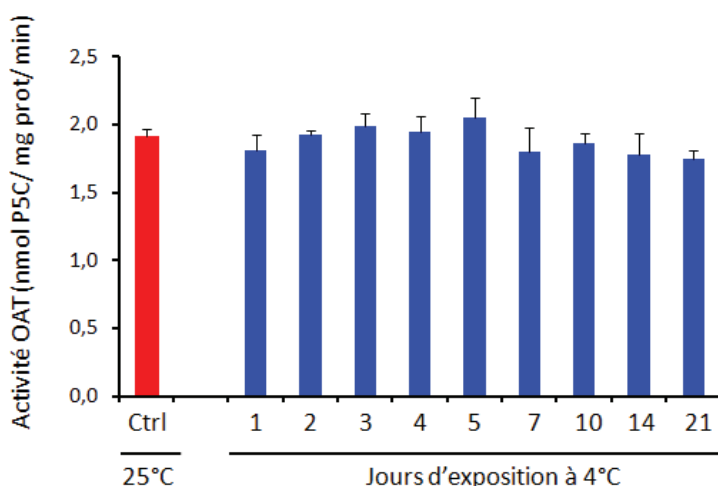
significative de l'activité OAT de 119% par rapport à la valeur témoin (Test U de Mann-Whitney ;  $P < 0,0001$  ; J4 à J21, 4°C vs 25°C) (Fig. 60).

### III.5 - Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT des muscles squelettiques

#### III.5.1 – Le muscle gastrocnémien

Nous avons choisi les muscles gastrocnémiens, un muscle mixte de taille importante, pour étudier les effets de l'exposition au froid sur l'activité OAT des muscles squelettiques, principaux effecteurs de la thermogenèse de frisson.

L'activité OAT musculaire des souris à 25°C reste stable tout au long des 21 jours d'expérimentation avec une valeur moyenne de :  $1,9 \pm 0,1$  nmol P5C/mg prot/min (Fig. 62). A 4°C, nos résultats montrent que l'activité OAT mesurée dans le gastrocnémien des souris mâles ne varie pas au cours de l'exposition au froid (Test de Kruskal-Wallis ;  $P = 0,44$ ), avec une valeur moyenne de  $1,9 \pm 0,1$  nmol P5C/mg prot/min, et aucune différence significative n'est observée par rapport à l'activité OAT moyenne mesurée dans le gastrocnémien des mâles témoins (Fig.62)

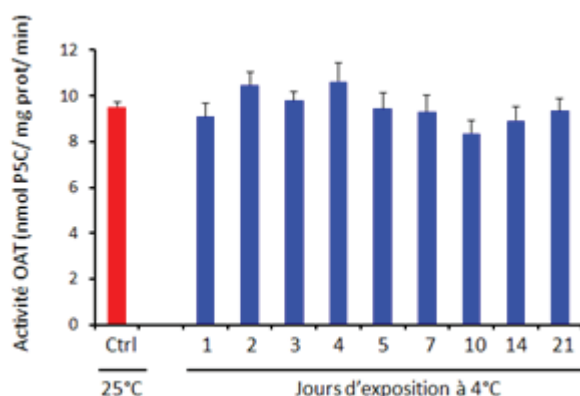


**Figure 61 : Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT du muscle gastrocnémien de souris mâles adultes.** Rouge : témoins, valeur relative moyenne de l'activité OAT mesurée dans le gastrocnémien des souris hébergées de 1 à 21 jours à 25°C ; Bleu : à 4°C. Les dosages de l'activité OAT ont été réalisés à partir d'un volume de 200 µL de surnageant incubé 60 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n = 6. Test U de Mann-Whitney ;  $^{\#}P \leq 0,025$  ;  $^{*}P \leq 0,0039$  ; 4°C vs 25°C.

#### III.5.2 – Le muscle cardiaque

L'exposition au froid n'ayant aucun effet sur le muscle gastrocnémien ni sur le quadriceps femoris (résultat non présenté ici) nous avons testé l'activité OAT du cœur dont l'activité contractile augmente classiquement au froid en parallèle de l'élévation du métabolisme

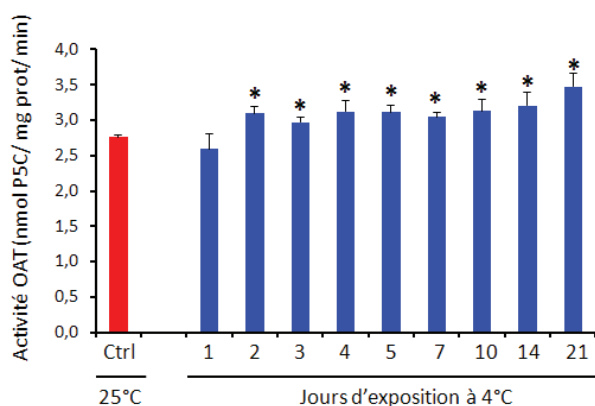
énergétique. L'activité OAT cardiaque des souris maintenues à 25°C reste stable tout au long des 21 jours d'expérimentation avec une valeur moyenne de :  $9.52 \pm 0,2$  nmol P5C/mg prot/min (Fig. 62). Contrairement à notre hypothèse l'augmentation de l'activité contractile liée au stress thermique à 4°C n'entraîne aucun effet sur l'activité OAT cardiaque.



**Figure 62 : Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT du muscle cardiaque chez les souris mâles adultes.** Rouge : Témoins, valeur moyenne de l'activité OAT mesurée dans le muscle cardiaque des souris hébergées de 1 à 21 jours à 25°C ; Bleu : à 4°C. Les dosages ont été réalisés à partir d'un volume de 200 µL de surnageant, incubé 60 min à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n=6, Test U de Mann-Whitney,  $^{\#}P \leq 0,025$ ,

### III.6 - Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT du cerveau

Etant donné son rôle dans l'intégration des stimuli froids perçus par l'organisme et la coordination des réponses thermorégulatrices, nous avons exploré l'activité OAT du cerveau des souris mâles adultes au cours des 21 jours d'exposition à 4°C. Nos résultats montrent que l'activité OAT du cerveau des souris hébergées à 25°C ne varie pas au cours du temps avec une valeur moyenne de  $2,7 \pm 0,1$  nmol P5C/mg prot/min (Fig. 63). En revanche, chez les animaux soumis à 4°C pendant 21 jours, l'activité OAT augmente dès le deuxième jour pour se stabiliser à une activité maximale à J21 ( $3,5 \pm 0,2$  nmol P5C/mg prot/min) (Fig. 63).



**Figure 63 : Effet de l'acclimatation au froid sur l'activité OAT dans le cerveau de souris mâles adultes.** Rouge : Témoins, valeur moyenne de l'activité OAT mesurée dans le cerveau des souris hébergées de 1 à 21 jours à 25°C ; Bleu : à 4°C. Les dosages de l'activité OAT ont été réalisés à partir d'un volume de 200 µL de surnageant, incubé 60 minutes à 37°C. Moyenne  $\pm$  SEM, n=6. Test U de Mann-Whitney ; 4°C vs 25°C ; \*  $P < 0.05$ .

## IV - Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence des variations de l'activité OAT dans le foie, le BAT, le WAT et le cerveau des souris mâles adultes exposées à un stress thermique de 4°C pendant 21 jours. Ces modifications sont spécifiques de l'organe, probablement en liaison avec les perturbations hormonales et l'augmentation de l'apport protéique induites par l'augmentation de la prise alimentaire, conséquences directes d'une exposition au froid sur les organismes.

C'est sur l'activité OAT du foie que nous avons observé les effets les plus importants et rapides de l'exposition au froid. Sans doute faut-il les rattacher à l'augmentation conséquente de la prise alimentaire observée chez les souris. Nos données pondérales montrent en effet une prise alimentaire doublée sans qu'aucune modification de la masse des animaux ne soit observée. L'augmentation de la prise alimentaire au froid a été classiquement décrite chez les rongeurs (Klain *et al.* 1963 ; Anderson *et al.* 1969 ; Fregly *et al.* 1994b ; Bing *et al.* 1998 ; Beaudry & McClelland 2010 ; Bauwens *et al.* 2011). Si l'ingéré alimentaire double, l'apport protéique est également doublé et l'augmentation de l'ingéré protéique pourrait être responsable de l'augmentation de l'activité OAT hépatique. En effet, l'augmentation de la composition protéique de la ration est associée à l'accroissement de l'activité OAT hépatique (Pitot & Peraino 1963 ; Brennan *et al.* 1970 ; Mueckler *et al.* 1983 ; Merrill *et al.* 1985 ; Matsuzawa *et al.* 1994 ; Boon *et al.* 1999).

Il faut remarquer toutefois que de très larges variations de l'apport protéique (0 à 20% ; 20 à 60% ; 5 à 70%) sont en général nécessaires pour augmenter l'OAT hépatique (Klain & Vaughan 1963 ; Anderson *et al.* 1969 ; Fregly *et al.* 1994b ; Bing *et al.* 1998 ; Beaudry & McClelland 2010 ; Bauwens *et al.* 2011). D'autre part, une augmentation plus modérée de l'apport protéique comme celle induite par le sevrage dans l'étude II (d'un facteur 2) n'a pas été suffisante pour modifier rapidement l'activité OAT hépatique des souriceaux. Il en découle que d'autres facteurs doivent être impliqués dans l'effet du froid. On peut imaginer que le glucagon dont les concentrations circulantes sont accrues au froid pourrait également jouer un rôle activateur (Kuroshima & Doi 1976 ; Kuroshima *et al.* 1978 ; Seitz *et al.* 1981). En effet le glucagon contrôle l'expression de l'OAT aux niveaux traductionnel et post-traductionnel chez le rat (Nakajima & Ishikawa 1971 ; Lyons & Pitot 1976 ; Hunter & Harper 1977 ; Mueckler *et al.* 1983). L'effet du glucagon sur les hépatocytes serait médié par la voie AMPc puisque l'addition *in vitro* de

glucagon et d'AMPC à des hépatocytes isolés de foie de rats soumis à un régime hypoprotéiné, produit une augmentation de la traduction et de la transcription de l'*Oat* au même titre qu'un régime hyperprotéiné (Merrill *et al.* 1985).

Sur le plan métabolique, les protéines ingérées sont d'abord dégradées dans l'intestin en acides aminés et composés  $\text{NH}_4^+$ , lesquels transportés jusqu'au foie sont catabolisés en bicarbonate et  $\text{NH}_4^+$ . La toxicité de ces composés  $\text{NH}_4^+$ , pour le cerveau en particulier, associée à leur renouvellement constant confère au foie un rôle central dans le métabolisme azoté. Le processus majeur de détoxification est assuré par le cycle de l'ornithine, situé dans les hépatocytes péri-portaux des lobules hépatiques (Jungermann & Kutz 1989 ; Meijer *et al.* 1990 ; Gebhardt 1992). La carbamoylphosphate synthétase, responsable de la synthèse de l'urée et première enzyme du cycle de l'ornithine, joue un rôle clé dans cette voie métabolique. Comme la carbamoylphosphate synthétase a une forte activité mais une faible affinité pour le  $\text{NH}_4^+$ , tous les ions ammonium ne sont pas convertis en urée dans la zone périportale et servent à la synthèse d'acides aminés non essentiels et des molécules azotées comme les purines ou pyrimidines. La glutamine synthétase (GS) localisée dans les hépatocytes situés autour de la veine centro-lobulaire, possède une forte activité et une forte affinité pour les composés  $\text{NH}_4^+$ , elle empêche alors leur retour dans la circulation périphérique. Mais, pour remplir complètement sa fonction, cette enzyme a besoin d'un taux suffisant de glutamate et c'est là que l'OAT intervient. Elle est colocalisée avec la GS et assurerait l'approvisionnement en glutamate à partir de l'ornithine, seul présent dans cette zone péri-veineuse (Boon *et al.* 1999). Nos résultats montrent d'ailleurs une augmentation de 185% de sa vitesse maximale de réaction. Ainsi, l'augmentation de l'activité OAT mesurée dans le foie en réponse à une exposition au froid servirait au moins en partie à fournir le glutamate nécessaire à la détoxification de l'organisme. Cette conclusion est cohérente avec les travaux de López-Soriano et Alemany (1988) qui montrent qu'une exposition à 4°C pendant 12 jours double l'activité de la GS hépatique chez le rat.

En plus d'être le précurseur du glutamate, l'ornithine, catabolisé par l'OAT, est aussi un précurseur de la proline, de la glutamine, des acides aminés glucoformateurs *via* la néoglucogénèse. L' $\alpha$ -cétoglutarate, également formé, conduit à l'oxaloacétate qui est un substrat clé de la néoglucogénèse hépatique et rénale (Shiota *et al.* 1985 ; Shiota *et al.* 1995). On pourrait donc imaginer un rôle clé de l'OAT hépatique dans la néoglucogénèse accrue au froid notamment sous le contrôle du glucagon. L'augmentation de l'OAT pour fournir des



molécules glucoformatrices serait cohérente avec l'augmentation observée au froid d'autres enzymes impliquées dans la néoglucogenèse comme la phosphoenolpyruvate carboxykinase [EC 4.1.1.32] et la pyruvate kinase [EC 2. 7. 1. 40] (Nakagawa & Nagai 1970). Cette néoglucogenèse activée au froid pourrait alimenter en substrats énergétiques les processus thermogènes énergivores.

De manière surprenante, nous n'avons pas observé de modification de l'activité OAT rénale. Le rein est pourtant un site majeur de néoglucogenèse et c'est une véritable coopération entre le rein et le foie qui assure le maintien de l'homéostasie azotée. Nos résultats montrent que l'exposition au froid des animaux ne modifie pas la différence artério-véneuse en arginine de part et d'autre du rein, ce qui suggère une production d'arginine constante si le débit de perfusion sanguine rénale est constant. Effectivement, chez le rat exposé au froid, le débit sanguin rénal ne semble pas modifié (Adan *et al.* 1994). Ces observations tendraient à conforter l'absence d'activation de l'OAT rénale que nous avons mise en évidence mais d'autres investigations seront nécessaires pour éclaircir ce point. Il est également possible que les capacités enzymatiques rénales, notamment pour l'OAT soient suffisantes pour assurer une activation métabolique rénale au froid alors que d'autres tissus comme le foie nécessiteraient une augmentation de certaines activités enzymatiques pour subvenir à des besoins cellulaires fortement accrus.

A l'échelle de l'organisme, ce serait donc essentiellement l'augmentation du catabolisme hépatique de l'ornithine qui pourrait ainsi approvisionner les processus thermogènes en substrats énergétiques et notamment en glucose. Il est par exemple rapporté que l'utilisation du glucose par le tissu adipeux brun, est augmentée de 21 fois chez des rats soumis à une exposition prolongée au froid par rapport à celle des animaux témoins (Greco-Perotto *et al.* 1987). Cette néoglucogenèse activée au froid pourrait également alimenter en substrats énergétiques la thermogenèse de frisson musculaire déclenchée dès les premiers jours d'exposition au froid, ce qui est cohérent avec le doublement de l'activité OAT hépatique constatée au même moment; l'activité thermogène de frisson étant associée à une forte activité glycolytique.

Dans notre étude, nous avons constaté l'augmentation de la masse du BAT qui résulte de son activation et de la mise en place des mécanismes d'acclimatation au froid (NST) (Ikemoto *et al.* 1967 ; Smith & Horwitz 1969 ; Fregly *et al.* 1994a ; Cannon & Nedergaard 2004 ; Beaudry & McClelland 2010 ; Bauwens *et al.* 2011 ; Mineo *et al.* 2012). Si la masse de BAT augmente,



l'activité OAT du BAT diminue par contre rapidement et se maintient à partir du 7<sup>ème</sup> jour d'exposition au froid à un taux inférieur de 26% par rapport à celui des animaux témoins. Ce résultat apparaît surprenant si l'on considère que le froid induit une activation thermogène du BAT et une biogenèse mitochondriale, dès les premiers jours d'exposition. Il est alors difficile d'associer une diminution de l'activité OAT à la forte augmentation induite par le froid de l'utilisation du glucose par les adipocyte bruns (Cannon & Nedergaard 2004). De façon intéressante, cette diminution de l'activité OAT s'accompagne d'une forte augmentation de la concentration du BAT en spermine, polyamine résultant d'une série de réactions enzymatiques initiée par la décarboxylation de l'ornithine par l'ornithine décarboxylase (ODC). Ces résultats pourraient traduire une compétition entre la voie de l'OAT et la voie de synthèse des polyamines pour l'ornithine. Les polyamines ainsi formées pourraient soutenir l'hyperplasie du BAT observée dès les premiers jours au froid comme le suggèrent les récentes études qui associent la fonction des polyamines à la croissance et à la prolifération cellulaire (Wallace *et al.* 2003). La réduction de l'OAT permettrait également de privilégier l'utilisation de l'arginine pour la synthèse protéique fortement stimulée dans un tissu en phase d'hyperplasie importante. Si la finalité des variations de l'OAT dans le BAT peut être argumentée, le contrôle de cette diminution apparaît moins clair. Au vu du rôle majeur joué par l'activité sympathique dans l'activation thermogénique et l'hyperplasie des adipocytes bruns lors de l'exposition au froid (Cannon & Nedergaard 2004), un rôle inhibiteur de la noradrénaline sur l'expression du gène de l'OAT pourrait être évoqué. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour éclaircir ce point.

Contrairement à ce qui est observé dans le BAT, une augmentation de l'activité OAT accompagne la diminution de la masse du WAT, consécutive à l'activation métabolique et à l'utilisation des réserves lipidiques lors de la phase chronique de l'exposition au froid (Bauwens *et al.* 2011). Ces résultats illustrent la différence de fonctionnalité entre les tissus adipeux blanc et brun lors de l'exposition au froid, l'hypertrophie du BAT étant associée à une réduction de l'OAT alors que l'atrophie du WAT est associée à une hyperactivité de l'OAT. L'augmentation de l'activité OAT dans le WAT favoriserait la formation de glutamate qui pourrait être catabolisé en  $\alpha$ -cétooglutarate par la GLDH pour intégrer le cycle de Krebs. Or, il a été montré qu'une exposition au froid provoque une diminution de l'activité de cette enzyme dans le WAT de rat (López-Soriano & Alemany 1986). Il en résulterait alors une augmentation du glutamate intracellulaire qui associé au GABA (acide gamma-aminobutyrique), mis en évidence

récemment dans les adipocytes du WAT (Nicolaysen *et al.* 2007), pourrait avoir un rôle paracrine dans la coordination de la libération ou de la captation des acides gras et autres substrats métaboliques, du ou vers le sang. Cette hypothèse pourrait être étayée par l'activité OAT du WAT qui se maintient à un niveau élevé après 7 jours d'exposition au froid alors que les animaux, face à la contrainte énergétique, utilisent leurs réserves en triglycérides et acides gras par une lipolyse accrue au froid (Chaffe & Roberts 1971). Cette régulation locale est probablement de moindre importance par rapport à la régulation centrale assurée par le système sympathique. Le cerveau est le centre intégrateur des stimuli froids perçus par l'organisme, c'est lui qui, par le biais de neurotransmetteurs dont le glutamate, précurseur du GABA, provoque l'activation du BAT (Amir 1990a ; Amir 1990b ; Halvorson *et al.* 1990 ; Amir & De Blasio 1991 ; Yoshimatsu *et al.* 1993). Des récentes études (Kong *et al.* 2012) ont montré que le GABA avait un rôle primordial dans l'augmentation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Nos résultats montrent une augmentation précoce de l'OAT mesurée dans le cerveau des souris exposées à 4°C. La plus grande quantité de glutamate générée pourrait donc accroître la quantité de neurotransmetteurs GABA au niveau de l'hypothalamus et son effet orexigène qui correspond tout à fait à l'augmentation rapide de la prise alimentaire chez les souris exposées au froid.

Des études précédentes ont montré que la testotéronémie est un régulateur important de l'activité OAT chez la souris. Elle régule négativement l'expression et l'activité de l'OAT rénale (Levillain *et al.* 2005b; Levillain *et al.* 2011) et nos travaux de l'étude II ont démontré que la suppression de la testotérone par orchidectomie des souris entraîne une augmentation de l'activité OAT dans le WAT et les muscles squelettiques au cours de la croissance post natale. Ainsi, la diminution de la testostéronémie qui se produit au cours de l'exposition au froid (Moshkin *et al.* 1993) pourrait expliquer l'augmentation de l'activité OAT mesurée dans le WAT des souris mâles.

Dans cette logique, une augmentation de l'activité OAT musculaire aurait dû être observée chez les souris exposées au froid et ceci d'autant plus que la première réponse adaptative mise en place par les endothermes pour tenter de maintenir leur homéostasie thermique constante est l'activation de la thermogenèse de frisson qui a lieu dans les muscles squelettiques (Stoner 1971 ; Beaudry & McClelland 2010). La stimulation de leur activité contractile nécessite alors un apport en substrats énergétiques qui aurait pu justifier une augmentation de leur activité OAT. Or, aucune modification de cette activité OAT musculaire n'a été observée ni pendant la phase

aiguë, ni pendant la phase chronique de l'exposition au froid. Il en est de même pour l'activité OAT du muscle cardiaque et c'est aussi surprenant compte tenu de l'augmentation de la fréquence cardiaque et de la tension artérielle induites par le froid (Fregly & Schechtman 1994 ; Fregly *et al.* 1994b). Une orientation préférentielle du métabolisme de l'ornithine vers la synthèse des polyamines *via* l'activation de l'ODC peut alors être évoquée, surtout que contrairement à la situation limitante en arginine des souriceaux, l'arginine est produite en quantité suffisante chez les souris adultes soumises au stress thermique froid. L'activation de cette voie pourrait préserver les capacités musculaires en limitant la protéolyse induite très rapidement chez les animaux exposés à 4°C. Cette interprétation est renforcée par l'action positive des polyamines sur la synthèse des protéines contractiles et l'activité contractile musculaire qui a été décrite par certains auteurs (Oriol-Audit 1978 ; Iakovlev 1979).

*Cette troisième étude, loin de clarifier le rôle de l'OAT, démontre cependant que son activité s'adapte de manière spécifique dans les organes qui sont impliqués dans les processus d'acclimatation au froid. Dans le foie, elle associerait un rôle de détoxification à celui de fournisseur d'acides aminés glucoformateurs, en réponse à l'augmentation conséquente de l'ingéré protéique. La diminution de l'activité OAT du BAT résulterait d'une compétition entre les voies métaboliques qui permettent les flux d'acides aminés. Cette compétition se ferait en faveur de la voie de synthèse des polyamines qui soutiennent l'hyperplasie du BAT consécutive à l'exposition au froid. Un phénomène identique pourrait se produire dans le muscle squelettique qui doit conserver ses capacités contractiles pour la thermogenèse de frisson. L'augmentation de l'activité OAT génère du glutamate et que ce soit au niveau du WAT ou du cerveau, ce glutamate pourrait avoir un rôle régulateur de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Enfin, la baisse de la testostéronémie classiquement rapportée chez les animaux exposés au froid pourrait contrebalancer les effets directs du froid sur l'activité OAT. Quoiqu'il en soit d'autres investigations s'avèrent nécessaires pour confirmer toutes nos hypothèses et préciser la finalité des composés synthétisés au cours des différentes voies métaboliques de l'OAT.*

**DISCUSSION  
GENERALE**



**ET PERSPECTIVES**

Les acides aminés sont des constituants essentiels de l'organisme, ils jouent un rôle capital dans le métabolisme cellulaire. En raison de l'absence de stock d'acides aminés non associés à des protéines, l'organisme doit gérer en permanence les différents flux inter-organes et inter-cellulaires, et assurer un équilibre permanent entre synthèse et dégradation. L'OAT est une enzyme clef puisque réversible et située au carrefour des voies métaboliques qui génèrent ces flux d'acides aminés. Elle permet de faire le lien entre l'arginine, acide aminé indispensable lors de la croissance pour la synthèse protéique, et le glutamate, l' $\alpha$ -cétoglutarate et la glutamine, permettant aux acides aminés d'intégrer les voies métaboliques des glucides et des lipides, substrats indispensables à la mise en place des mécanismes d'ajustement de l'organisme face à des contraintes énergétiques.

Notre travail montre la synthèse ubiquitaire de l'OAT chez la souris et fait apparaître certains tissus en particulier les muscles squelettiques, le BAT, le WAT, le cerveau comme des acteurs importants dans le métabolisme de l'ornithine et ceci dans des conditions de contrainte métabolique. La multiplication des investigations tissulaires chez la souris mâle et femelle constitue la grande originalité de notre étude puisque jusqu'à présent, l'OAT a été étudiée plutôt chez le rat et l'homme, en ciblant l'intestin, le foie et les reins, tissus qui coopèrent effectivement pour moduler le flux d'acides aminés d'origine intestinale vers les tissus périphériques.

### ***1 – L'OAT une enzyme exprimée de façon ubiquitaire***

Au cours de cette thèse, nous avons d'abord démontré que l'OAT est une enzyme exprimée dans de nombreux organes et établi une véritable cartographie de l'OAT murine. Ce travail complète celui de Yu et al. (2003) qui ont identifié l'expression du gène de l'OAT dans une dizaine d'organes chez la souris. Nous avons non seulement montré l'expression du gène mais mesuré l'activité de l'enzyme OAT dans plus de 20 organes et tissus de souris mâles et femelles, la présence des transcrits étant associée à une activité détectable. Nos résultats montrent clairement que l'activité OAT varie très fortement en fonction de l'organe et du sexe de l'animal. Un dimorphisme sexuel de l'activité OAT est mis en évidence dans 13 des organes étudiés. C'est ainsi que l'activité OAT des souris femelles est supérieure à celle des souris mâles dans le foie, le rein, la glande sous-maxillaire, le poumon, la glande surrénale, le thymus, le WAT, les muscles squelettiques. Cette activité OAT est mesurée classiquement par mg de protéines ou par mg de tissu frais, or si l'on considère la masse totale que représentent certains

organes ou tissus dans l'organisme, ils pourraient contribuer grandement au métabolisme global de l'ornithine. Nos résultats montrent en effet que le muscle squelettique présente une faible activité OAT par mg de protéines par comparaison à celle du foie, mais compte tenu de la masse musculaire totale de la souris, ce tissu est un des principaux contributeurs au métabolisme de l'ornithine. Cette forte contribution du tissu musculaire était insoupçonnée jusque-là au cours de la croissance post natale. Ajouté à cela, certains tissus comme le BAT et le WAT montrent une grande plasticité pondérale en fonction des contraintes énergétiques. Le moindre ajustement de cette enzyme aux changements métaboliques peut ainsi correspondre à une modification importante de l'activité OAT de la globalité du tissu.

Ces données nous amènent à repenser le dogme établi depuis de nombreuses années qui consiste à étudier l'activité OAT seulement dans le foie, les reins et l'intestin des souris (Riby *et al.* 1990 ; Lim *et al.* 1998 ; Yu *et al.* 2003 ; Levillain *et al.* 2005b ; Levillain *et al.* 2007 ; Ventura *et al.* 2009). Même si ces organes coopèrent efficacement pour assurer l'équilibre azoté de l'organisme, notre étude suggère de prendre en compte la contribution des autres organes dont l'activité OAT peut être non négligeable et modulée dans des situations physiologiques particulières comme la croissance postnatale ou lors de contraintes énergétiques comme l'exposition au froid.

Cependant, la plupart des organes présentent une hétérogénéité tissulaire et cellulaire et il a par exemple été démontré que dans le foie, l'intestin et le rein l'expression de l'OAT est restreinte à certaines zones du tissu et à certaines populations cellulaires. Ainsi, dans le foie de rongeurs, l'OAT est exprimée dans les hépatocytes péri-veineux (Brennan *et al.* 1970 ; Kuo *et al.* 1991), ce qui ne représente que 10% de l'organe. Dans l'intestin, l'OAT est exprimée uniquement dans les entérocytes au niveau des villosités intestinales (Riby *et al.* 1990 ; Lim *et al.* 1998 ; Yu *et al.* 2003). Dans le rein, l'OAT est exprimée dans la médulla au niveau des branches ascendantes de Henlé chez les mâles, alors que chez les femelles elle est exprimée au niveau cortical dans les tubes proximaux (Levillain *et al.* 2007). Une cartographie plus fine de l'expression cellulaire de l'OAT dans les tissus étudiés aurait, malgré sa lourdeur, grandement enrichi nos résultats. Ceci nous amène à considérer le caractère mixte des muscles squelettiques que nous avons utilisés dans nos travaux. Les variations du phénotype musculaire au cours de la croissance et en fonction des contraintes métaboliques est de plus bien connu (Close 1972 ; Walters & Constable 1993). Il serait donc intéressant de corrélérer les variations de l'activité OAT à la composition du muscle. Un pourcentage élevé de fibres oxydatives possédant

de nombreuses mitochondries pourrait aller de pair avec une activité OAT élevée. L'augmentation de l'activité OAT mesurée dans les muscles squelettiques au cours de la croissance pourrait ainsi correspondre pour partie à l'acquisition de leur caractère oxydatif.

## ***2 - Une enzyme dont l'activité varie de manière spécifique dans chaque organe, selon le sexe de l'animal et en fonction des contraintes métaboliques***

Nos deux études expérimentales ont ciblé des situations qui entraînent des ajustements métaboliques, les uns liés à la croissance post-natale, les autres à une exposition aiguë et chronique au froid. Ces deux situations ont en commun des modifications de la prise alimentaire et donc de l'apport azoté, et des modifications hormonales qui induisent une régulation précise du métabolisme azoté. Il s'avère que chaque organe participe à sa façon au maintien de l'équilibre des flux d'acides aminés, nous avons donc pris le parti d'analyser les variations de l'activité OAT et les implications potentielles par organe, le foie, les muscles squelettiques, le BAT et le WAT étant les organes et tissus qui montrent les plus grandes variations de l'activité OAT.

*Dans le foie*, l'activité OAT augmente au 22<sup>ème</sup> jour de la vie du souriceau. Le sevrage précoce n'ayant pas d'effet significatif sur l'activité OAT hépatique, nous ne pouvons rapporter son augmentation au passage d'une alimentation lactée contenant de 6 à 10 % de protéines à une alimentation solide dont la teneur en protéines est de 18%. Pourtant c'est bien l'augmentation importante de la prise alimentaire chez les souris adultes soumises à un stress thermique de 4°C qui semble induire une augmentation rapide et conséquente de l'activité OAT hépatique. L'immaturité de la machinerie enzymatique hépatique décrite chez les souriceaux (De Jonge *et al.* 1998) pourrait expliquer l'absence d'effet d'un sevrage anticipé ou bien une augmentation d'environ 10% de l'ingéré protéique serait insuffisante pour induire des modifications significatives de l'activité OAT hépatique. Cette augmentation de l'activité OAT pourrait servir en premier lieu à produire du glutamate, d'abord pour détoxifier l'organisme en éliminant les ions  $\text{NH}_4^+$  produits en excès par l'augmentation de l'apport protéique alimentaire (Kuo *et al.* 1991), puis pour alimenter la néoglucogenèse hépatique et rénale (Mallette *et al.* 1969) en réponse à l'activation métabolique induite aussi bien par la croissance que par l'exposition au froid. Au froid, l'excès d'acides aminés produits par une protéolyse activée (Chaffee & Roberts 1971) pourrait également être géré grâce à l'augmentation de l'activité OAT. Il aurait été intéressant d'empêcher l'augmentation de la prise alimentaire d'un groupe de souris soumises

au froid en les nourrissant au niveau de l'ingéré des témoins maintenus à 25°C pour mesurer le réel impact de l'ingéré protéique sur l'activité OAT hépatique. Des expériences de ce type réalisées chez le rat (Klain *et al.* 1963) ont montré que l'effet stimulateur du froid sur certaines enzymes du métabolisme hépatique des acides aminés n'était plus observé chez des rats pair-fed (arginase par exemple), alors que pour d'autres, l'effet du froid était conservé (Tyrosine- $\alpha$ -cétoglutarate transaminase par exemple). La protéolyse, notamment musculaire suffirait-elle alors à combler le déficit en acides aminés consécutifs à la contrainte énergétique ? L'exposition de souris OAT<sup>-/-</sup> au froid pourrait confirmer l'importance de l'OAT hépatique dans la gestion du métabolisme azoté.

*Dans les muscles squelettiques*, l'activité OAT varie fortement au cours du développement postnatal, mais reste constante au cours de l'exposition au froid. Au cours du développement postnatal (à l'âge de 20 jours), ce sont les muscles squelettiques, dont l'activité OAT totale est la plus forte, qui pourraient contribuer pour près de 50% à la production globale de P5C. Contrairement à ce qui se passe dans le foie, l'activité OAT est fortement perturbée par un sevrage précoce dans les muscles squelettiques. Ce qui nous a conduit à envisager que l'activité OAT tissulaire est régulée localement et en fonction des besoins cellulaires et/ou de l'organisme. Nous avons même envisagé que le flux généré par l'OAT musculaire puisse se faire dans le sens de la synthèse de l'ornithine plutôt que dans le sens de sa dégradation pour expliquer une augmentation de l'activité OAT jusqu'au 20<sup>ème</sup> jour, alors que les conditions en arginine sont limitantes, et sa diminution brutale dès le sevrage des animaux au 21ème jour. Cette hypothèse contredit l'idée classique d'une OAT fonctionnant dans le sens de la synthèse d'ornithine dans l'intestin alors qu'elle fonctionnerait dans le sens de la dégradation de l'ornithine dans les autres tissus. Pourtant un fonctionnement de l'OAT dans le sens de la synthèse serait possible chez les souriceaux non sevrés car la synthèse d'ornithine requiert du glutamate et la proline qui sont abondants dans le lait de souris (Meier *et al.* 1967). L'arginine économisée par la réduction de l'activité de la voir OAT pourrait alors servir de brique à la synthèse protéique musculaire et/ou de substrat à la voie des polyamines, activateurs potentiels de la croissance et du développement (Lee & MacLean 2011). L'arginine apparait en effet comme un des acides aminés dont la quantité utilisée pour la synthèse protéique dépasse la quantité apportée par l'alimentation, ce qui implique un apport indispensable par la synthèse endogène dans l'intestin (Davis *et al.* 1993). D'ailleurs, une supplémentation de 14 jours en arginine dès la naissance des souriceaux OAT<sup>-/-</sup> permet leur survie. C'est dire l'importance de

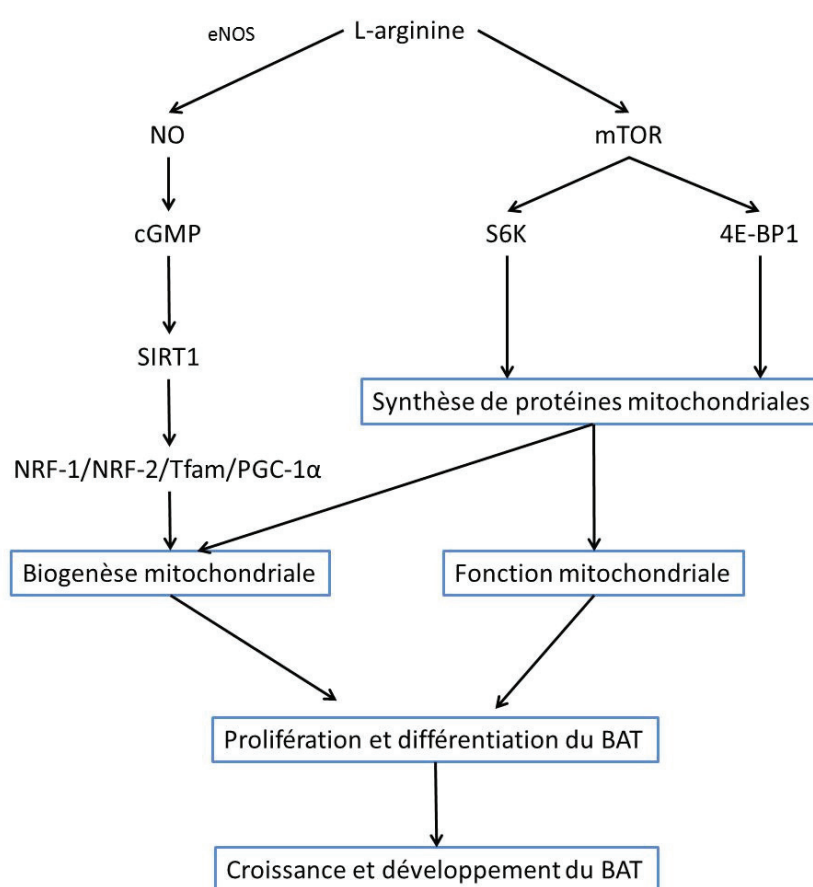


l'arginine dans le métabolisme général des acides aminés dans la période post-natale et c'est probablement l'apport en arginine par l'alimentation et la réduction des apports en glutamate et proline qui pourraient contribuer à la diminution de l'activité OAT musculaire après le sevrage. Le mécanisme par lequel l'arginine pourrait moduler l'activité OAT reste cependant à identifier. L'arginine pouvant être à l'origine d'oxyde nitrique (NO) ou moduler l'expression et l'activité de facteurs régulateurs de l'expression génique ou de l'activité métabolique comme PGC1- $\alpha$  et l'AMPK (Tan *et al.* 2012), on pourrait imaginer un contrôle de l'expression de l'OAT et donc de l'activité de l'enzyme par ces voies de régulations. Là encore des expériences complémentaires sont nécessaires pour clarifier cette hypothèse.

Ces hypothèses ouvrent des perspectives intéressantes. Il faudrait vérifier l'activation des autres voies métaboliques notamment celle de l'ODC, génératrice des polyamines. La réversibilité de l'OAT musculaire en faveur de la synthèse d'ornithine devra être confirmée. Il serait intéressant d'injecter de la gabaculine, inhibiteur de l'OAT, aux souriceaux avant leur sevrage et de mesurer les concentrations en arginine, ornithine et glutamate dans les muscles squelettiques. Une augmentation de la concentration tissulaire en glutamate et une diminution en ornithine et en arginine, pourrait argumenter notre hypothèse à condition que le glutamate non utilisé ne soit pas directement dirigé vers le cycle de Krebs.

*Dans le BAT*, l'activité OAT ne varie pas au cours du développement postnatal, mais elle diminue au cours de l'exposition au froid. Si le BAT est fortement activé lors des premiers jours après la naissance en raison du stress thermique lié au passage de l'environnement utérin dans un environnement dont la température ambiante est plus faible, l'activation thermogène du BAT tend ensuite à fortement diminuer pour des souriceaux maintenus en groupe dans une animalerie dont la température est régulée à 25°C. On peut donc penser que dans la période étudiée, le BAT n'était pas activé spécifiquement pour des besoins thermogéniques. C'est probablement ce qui a contribué à la relative stabilité de l'activité OAT dans le BAT au cours de la croissance postnatale. Chez l'adulte exposé au froid en revanche, nous avons noté une diminution significative de l'activité OAT dès le 2<sup>ème</sup> jour de l'exposition. Résultat surprenant si l'on considère que la contrainte énergétique induit une biogenèse mitochondriale dès les premiers jours d'exposition au froid. Cette diminution de l'activité OAT s'accompagne d'une forte augmentation de la concentration en spermine qui suggère une activation de l'ODC. Les polyamines ainsi formées pourraient soutenir l'hyperplasie du BAT comme le suggèrent les récentes études qui associent la fonction des polyamines à la croissance et à la prolifération

cellulaire (Wallace *et al.* 2003). Ces résultats pourraient traduire une compétition entre la voie de l'OAT et la voie de synthèse des polyamines pour leur même substrat, l'ornithine. La réduction de l'activité OAT dans le BAT pourrait également favoriser l'utilisation de l'ornithine pour former de la citrulline via l'ornithine carbamoyltransférase pour permettre la formation d'argininosuccinate dans le cytoplasme et la formation d'arginine via l'argininosuccinate lyase. A partir de cette arginine cytoplasmique, on pourrait soit favoriser la formation de NO via la NO synthase ou stimuler la voie mTor. Il en découlerait une activation de la synthèse de protéines mitochondriales et une mitochondriogenèse accrue (Fig. 64 ; Tan *et al.* 2012).



**Figure 64 : Activation de la croissance du tissu adipeux brun par l'arginine** (d'après Tan *et al.* 2012)

Cette hypothèse n'est toutefois pas supportée par des travaux chez le rat qui montrent qu'une exposition chronique de 15 jours à 4°C modifie l'homéostasie intra-tissulaire des acides aminés dans le BAT (López-Soriano & Alemany 1987). Ces auteurs décrivent en effet une concentration

tissulaire en glutamate doublée alors que les concentrations en arginine et en ornithine sont diminuées de moitié, ce qui suggérerait plutôt un catabolisme accru de l'ornithine pour former du glutamate, surtout qu'ils constatent de plus une augmentation de l'activité de la glutamate deshydrogénase et une diminution de la glutamine synthétase qui conduisent à une activation du cycle Krebs. Toutefois ces mêmes auteurs ont montré (López-Soriano *et al.* 1988) à partir des différences artério-veineuses en acides aminés et du débit sanguin tissulaire que le BAT des rats exposés 15 jours au froid augmentait fortement son captage de glutamate (x19) et de glutamine (x10). La réduction de l'activité OAT du BAT que nous avons observée pourrait donc être cohérente avec les données tissulaires (López-Soriano & Alemany 1987) si l'utilisation de l'arginine par la NO synthase est effectivement fortement stimulée dans le BAT au froid et si le glutamate provient du sang ou de la glutamine. Une étude plus approfondie des concentrations tissulaires en acides aminés et des différentes voies métaboliques de l'ornithine devra être poursuivie chez la souris pour clarifier le véritable rôle de l'OAT dans l'activation du BAT au froid.

Dans le WAT, l'activité OAT diminue après le sevrage (21<sup>ème</sup> jour) des souriceaux alors qu'elle augmente de manière très significative chez les souris adultes dès le 2<sup>ème</sup> jour de leur exposition au froid. Un rôle commun de l'OAT se dégage de ces deux situations, fournir des substrats énergétiques à partir de la synthèse de glutamate, et ceci en fonction des besoins énergétiques de l'organisme. L'activité OAT du WAT semble donc varier parallèlement à l'activité lipolytique du tissu. Après le sevrage, l'activité lipolytique est probablement réduite en liaison avec une alimentation riche fournie *ad libitum* au profit d'une lipogenèse et un stockage accrue des triglycérides conduisant au développement des dépôts de tissu adipeux blanc. Dans ces conditions l'activité OAT est rapidement réduite. Au froid par contre, les besoins en substrats énergétiques augmentent considérablement et la lipolyse est fortement activée en réponse à l'action de différentes hormones lipolytiques parmi lesquelles le glucagon dont la concentration circulante est accrue au froid (Kuroshima & Doi 1976 ; Kuroshima *et al.* 1978 ; Seitz *et al.* 1981). Comme le glucagon contrôle l'expression de l'OAT aux niveaux traductionnel et post-traductionnel dans le foie de rat (Nakajima & Ishikawa 1971 ; Lyons & Pitot 1976 ; Hunter & Harper 1977 ; Mueckler *et al.* 1983), on pourrait imaginer une stimulation similaire dans le WAT de souris. Dans ces conditions, l'activité OAT du WAT serait rapidement augmentée au froid en parallèle de l'activation des processus thermogènes, gros consommateurs d'énergie. L'augmentation de l'activité OAT pourrait permettre de fournir des précurseurs pour la

néoglucogénèse activée au froid dans le foie et le rein (Chaffee & Roberts, 1971). Le glutamate pourrait également être métabolisé en acétyl-CoA et servir de précurseur à la lipogénèse (Kowalchuk *et al.* 1988) afin de reconstituer des stocks de triglycérides fortement réduits par la lipolyse accrue. Par ailleurs, la découverte récente de la présence de GABA dans le WAT (Nicolaysen *et al.* 2007) suggère également une probable « neuromédiation » locale dans laquelle le glutamate jouerait le rôle de médiateur paracrine pour synchroniser la lipolyse dans les adipocytes. Nos résultats sur le WAT renforcent l'idée que le métabolisme des acides aminés est loin d'être négligeable dans le tissu adipeux blanc en accord avec la littérature chez le rat et l'homme (Kowalchuk *et al.* 1988 ; Patterson *et al.* 2002).

Comme la littérature le laissait supposer, l'activité OAT varie de manière propre à la souris. Les variations mesurées sont spécifiques de l'organe et du rôle que joue l'organe dans le maintien de l'équilibre azoté face à des contraintes de types métaboliques.

### **3 - Une enzyme dont la régulation de l'expression est complexe**

Plusieurs facteurs semblent impliquer dans la régulation de l'expression de l'OAT. Nous avons déjà évoqué l'influence de l'apport protéique ingéré sur l'activité OAT hépatique et sur l'activité OAT musculaire lors de la croissance post natale.

Il a été démontré que la testostérone régule négativement l'expression de l'OAT rénale chez la souris (Levillain *et al.* 2007 ; Levillain *et al.* 2011) et qu'elle est responsable de l'existence d'un dimorphisme sexuel de l'activité OAT en faveur des femelles. Nos résultats montrent que tous les tissus explorés présentent un dimorphisme sexuel de l'activité OAT, sauf le cœur, le cerveau et le BAT. Ceci est assez surprenant puisque l'OAT murine est codée par un unique gène contenant la séquence nucléotidique spécifique des ARE (AndrogenResponseElement)(Nelson *et al.* 1999 ; Verrijdt *et al.* 2003 ; Levillain *et al.* 2011). La testostérone devrait donc exercer un effet similaire sur tous les organes. Une explication possible serait l'absence de récepteurs nucléaires à la testostérone dans certains organes empêchant ainsi sa fixation sur les ARE et son action sur l'expression de l'*Oat*. On peut également proposer que la régulation tissu-spécifique de l'expression de l'*Oat* par la testostérone puisse dépendre de l'expression tissu-spécifique de protéines co-régulatrices qui affectent l'activité transcriptionnelle des récepteurs des androgènes (Heinlein & Chang 2002).

Nos situations expérimentales, qu'elles soient physiologiques, la croissance postnatale ou contraignantes pour l'organisme, l'exposition au froid, induisent des modifications hormonales

qui impactent l'activité OAT en fonction de l'organe ou du tissu considéré. Dans notre travail, nous avons confirmé l'importance de la testostérone dans la régulation de l'expression de l'OAT dans le foie, le WAT et les muscles squelettiques. Les variations de l'activité OAT observées dans ces organes au moment de la puberté et la confirmation des effets de la testostérone par orchidectomie des animaux montrent clairement que les androgènes contribuent aux changements importants de l'activité OAT mais avec des effets opposés selon les tissus. La testostérone stimule l'activité hépatique alors qu'elle régule négativement l'activité OAT du muscle squelettique et du WAT. La diminution de la testostéronémie lors de l'exposition au froid est bien connue et serait en partie responsable de l'augmentation de l'activité OAT dans le WAT. En raison de l'importance de la régulation du BAT et du WAT par le système nerveux sympathique lors d'une exposition au froid, il serait intéressant de mesurer les effets de la noradrénaline sur l'activité OAT de ces deux organes

Les variations de l'activité OAT observées dans le foie, les muscles et le WAT au cours de la croissance postnatale sont corrélées à l'évolution des taux plasmatiques de corticostérone qui pourrait avoir un rôle dans la régulation post-natale de l'activité OAT de ces organes.

Les hormones thyroïdiennes pourraient aussi être impliquées dans cette régulation postnatale en raison i) de l'augmentation rapide du taux de 3,5,3'-triiodo-L-thyronine ( $T_3$ ) plasmatique à la naissance et qui atteint un maximum durant la deuxième semaine du développement postnatal de la souris (Hadj-Sahraoui *et al.* 2000) et ii) de l'action exercée par la  $T_3$  sur l'expression de l'OAT (Shull *et al.* 1995b). Il a été de plus démontré chez la souris, que le gène codant l'OAT contient dans sa séquence 5' régulatrice une séquence similaire à la séquence codant pour les THRE (Thyroid Hormone Responsive Element) (Mitchell *et al.* 1988). La  $T_3$  agirait donc directement sur la transcription du gène de l'OAT par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires fonctionnant comme des facteurs de transcription activés par la liaison de leur ligand ou bien directement au niveau du gène lui-même *via* la probable séquence THRE. De même, lors de l'exposition au froid, la synthèse et la libération des hormones thyroïdiennes sont augmentées (Melander & Rerup 1968 ; Dubuc 1991). Elles pourraient donc jouer un rôle important dans la régulation de l'expression de l'*Oat*, notamment dans les muscles squelettiques.

Le glucagon semble également être une hormone importante de la régulation de l'expression de l'*Oat* notamment dans des situations de déficit énergétique relatif comme lors de la période pré-sevrage ou lors de l'exposition au froid. Cette hormone pancréatique connue pour

contrôler l'expression de l'*Oat* aux niveaux traductionnel et post-traductionnel dans le foie de rat (Nakajima & Ishikawa 1971 ; Lyons & Pitot 1976 ; Hunter & Harper 1977 ; Mueckler *et al.* 1983) pourrait réguler positivement l'expression de l'*Oat* dans le foie et le WAT de souris.

La régulation hormonale de l'activité OAT reste complexe en raison de l'action synergique des hormones pour une même contrainte métabolique. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de leur synthèse, en particulier lors des périodes d'inductions hormonales, croissance, puberté, stress thermique, pourrait clarifier le rôle de chacune d'entre elles dans la régulation de l'OAT.

#### **4 – Existe-t-il des isoformes de l'OAT ?**

La disparité des réponses de l'OAT observée dans notre travail, sa régulation spécifique pour chaque tissu, selon le sexe de l'animal, les différences de  $K_M$  mesurées entre les différents organes ou tissus ainsi que les différences observées dans l'efficacité de l'inhibition de la réaction enzymatique par la gabaculine sont des arguments en faveur de l'existence d'isoformes de l'OAT. Hypothèse réfutée par des études qui ont comparé l'OAT issue du foie, du rein et de l'intestin grêle de rat et qui ont montré que leur comportement lors de la centrifugation et leur comportement électrophorétique, leur spectre d'absorption, leur pH optimal ou bien leur affinité pour l'ornithine ainsi que pour l' $\alpha$ -cétoglutarate sont identiques (Sanada *et al.* 1970). Pourtant, une nouvelle forme d'OAT résistante au 5-fluoromethylornithine (5-FMO), un autre inhibiteur de l'OAT, et logiquement appelée « OAT 5FMO résistante » a bien été découverte dans certains tissus de souris (Daune & Seiler 1988 ; Daune *et al.* 1988). Cette « OAT 5-FMO résistante » montre, en fonction du tissu étudié, une plus ou moins grande capacité à être inhibée par la gabaculine (Daune *et al.* 1988 ; Alonso & Rubio 1989). L'existence d'une telle forme d'OAT dans les différents organes de notre étude pourrait expliquer les variations du pourcentage d'inhibition de l'activité OAT observées en présence de gabaculine.

Il serait donc intéressant d'explorer plus précisément cette hypothèse de l'existence d'isoformes de l'OAT en fonction de l'organe et du sexe des animaux. Ces iso-formes pourraient avoir des propriétés physico-chimiques différentes (Volpe *et al.* 1974) ou bien des tailles différentes (Sanada *et al.* 1970). Elles pourraient être ainsi différenciellement identifiées par électrophorèse 2D en fonction de leur profil de migration.

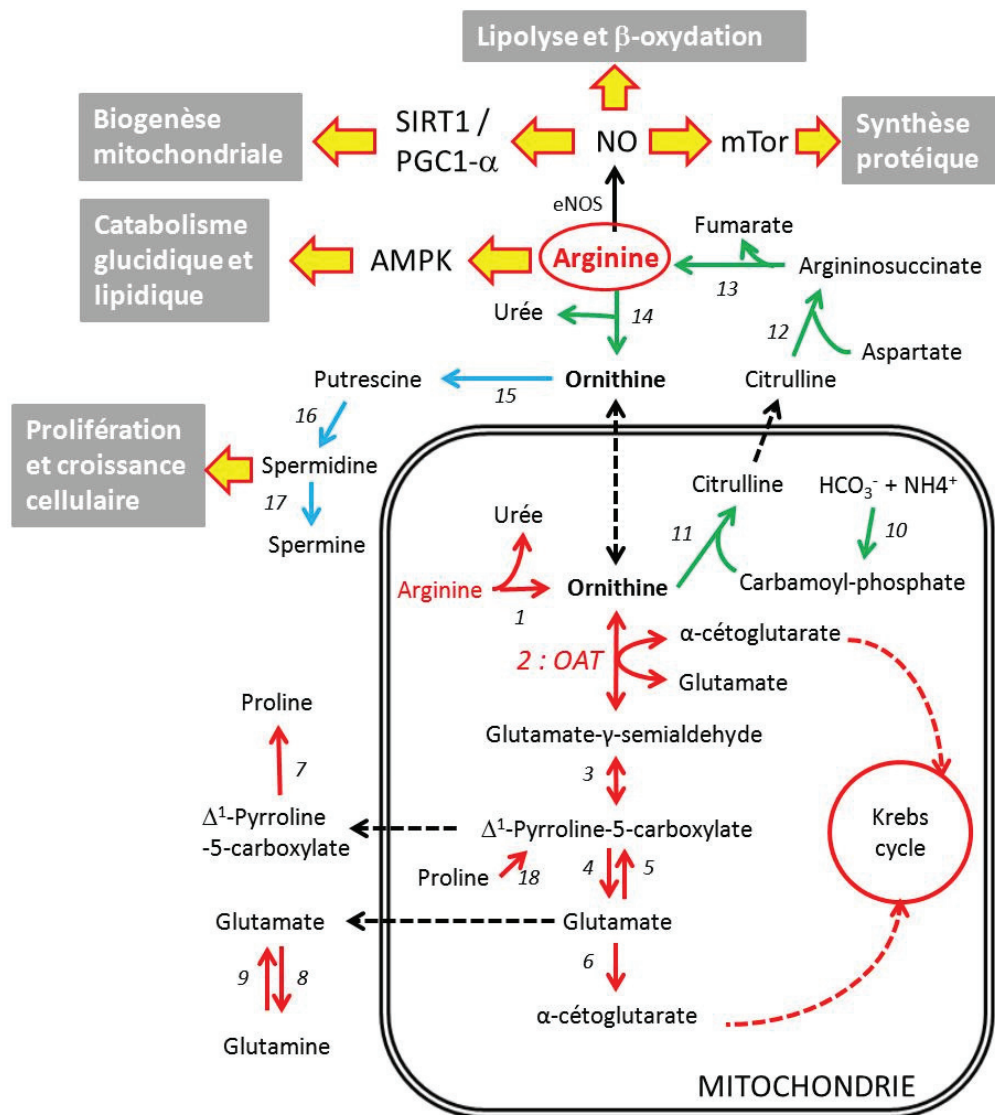
## **5 – Un rôle potentiel de l'OAT dans la modulation des concentrations tissulaires d'arginine ?**

Notre travail apporte donc de nombreuses informations sur les variations locales de l'activité OAT en fonction des changements métaboliques induits par une modification de l'ingéré protéique et ou une modification du statut hormonal chez la souris. Nos résultats encouragent à considérer que l'activité OAT des muscles squelettiques, du WAT et du BAT participe au même titre que le foie et les reins au maintien de l'équilibre azoté de l'organisme surtout dans des conditions de contraintes métaboliques.

A travers les résultats obtenus dans les différentes situations expérimentales utilisées, il semble que la disponibilité en arginine soit un facteur qui module profondément l'activité OAT, ce qui pourrait expliquer les variations plus marquées de l'activité OAT au cours de la croissance post natale où la disponibilité en arginine peut être limitante que lors d'une contrainte énergétique chez la souris adulte. A l'inverse l'activité OAT pourrait contribuer à moduler l'arginine dans les cellules. En effet, la régulation complexe de l'OAT pourrait peut être correspondre à son positionnement métabolique pour fournir des précurseurs néoglucogéniques ou des intermédiaires du cycle de Krebs et contribuer à la synthèse et à la dégradation de l'arginine. L'activité de l'OAT pourrait donc contribuer à moduler le devenir et la concentration cellulaire de l'arginine. Cet acide aminé apparaît central (Fig. 65) dans de multiples régulations cellulaires (Wu & Morris 1998 ; Wu *et al.* 2009 ; Tan *et al.* 2012). L'intérêt pour l'arginine est renforcé par l'observation que la supplémentation de l'aliment par cet acide aminé réduit l'obésité, augmente la dépense énergétique, stimule le BAT et réduit la masse grasse (McKnight *et al.* 2010 ; Tan *et al.* 2012).

Par son activité l'OAT pourrait donc largement moduler la concentration cellulaire de l'arginine et donc moduler de multiples phénomènes cellulaires. En fonction de la disponibilité de l'arginine, des contraintes métaboliques et des stimulations endocrines exercées sur les cellules, l'OAT pourrait fonctionner comme un pivot central entre les voies métaboliques et les voies de signalisation cellulaire. Par extension, nos résultats mettent en évidence que l'idée simpliste selon laquelle l'OAT fonctionnerait dans le sens de la synthèse d'ornithine dans l'intestin et dans le sens de la dégradation de l'ornithine dans tous les autres tissus doit être largement réévaluée.





**Figure 65 : Rôles potentiels de l'OAT dans l'activité métabolique et les régulations cellulaires.** Ce Schéma synthétique complète la figure 2 (voir légende pour la correspondance numéros/enzymes) et résume nos éléments de discussion. Les flèches jaunes indiquent des effets stimulateurs sur des voies de signalisation ou des phénomènes cellulaires. D'après Wu *et al.* 2009 et Tan *et al.* 2012.

A ce stade, il apparaît essentiel que les études futures ne considèrent pas uniquement l'activité de l'OAT mais incluent également l'étude plus précise des différentes voies métaboliques de l'ornithine et des différents substrats et molécules cellulaires (au moins par organe) pour avoir une vision plus intégrative des processus mis en jeu et du sens des réactions biochimiques. Des études utilisant des traceurs apparaissent cruciales pour apprécier les flux de métabolites dans et entre les organes et selon les conditions expérimentales. Ceci permettrait de confirmer l'orientation préférentielle du métabolisme de l'ornithine vers la voie des polyamines dans les



phénomènes de prolifération cellulaire et de croissance tissulaire, vers la formation d'arginine ou vers les voies néoglucogéniques ou anaplerotiques. A l'évidence, l'OAT reste pour nous une enzyme complexe qui ne nous a pas révélé tous ses secrets.

**En conclusion**, l'expression ubiquitaire de l'OAT et ses variations d'expression et d'activité en relation avec des contraintes énergétiques liées à la croissance, le sevrage et l'exposition au froid soulignent l'importance potentielle de cette enzyme dans de multiples processus cellulaires. Plus largement, ces résultats illustrent que le métabolisme des acides aminés, bien que souvent trop peu étudié, peut avoir une grande importance dans les réponses physiologiques de l'organisme aux contraintes métaboliques rencontrées au cours de la vie. Les différentes voies du métabolisme des acides aminés, qui peuvent contribuer à fournir des briques à la synthèse de protéines, des substrats énergétiques ou des facteurs d'activation cellulaire mériteraient donc de plus amples investigations lors de l'étude des contraintes métaboliques. Ces processus pourraient représenter des étapes clés dans les réponses adaptatives des organismes à leur environnement.

# BIBLIOGRAPHIE



## A

- Adán, C., Ardévol, A., Remesar, X., Alemany, M. & Fernández-López, J.A. 1994 Effect of cold-exposure on rat organ blood flows. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* **102** (1): 55-59.
- Ahima, R.S., Dushay, J., Flier, S.N., Prabakaran, D. & Flier, J.S. 1997 Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J. Clin. Invest.* **99**: 391–395.
- Alonso, E. & Rubio, V. 1989 Participation of ornithine aminotransferase in the synthesis and catabolism of ornithine in mice. Studies using gabaculine and arginine deprivation. *Biochem. J.* **259**: 131–138.
- Amir, S. 1990a Stimulation of the paraventricular nucleus with glutamate activates interscapular brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Brain Res.* **508** (1): 152-155.
- Amir, S. 1990b Activation of brown adipose tissue thermogenesis by chemical stimulation of the posterior hypothalamus. *Brain Res.* **534** (1-2): 303-308.
- Amir, S. & De Blasio, E. 1991 Activation of brown adipose tissue thermogenesis by chemical stimulation of the hypothalamic supraoptic nucleus. *Brain Res.* **563** (1-2): 349-352.
- Andersen, M.L., Bignotto, M., Machado, R.B. & Tufik, S. 2004 Different stress modalities result in distinct steroid hormone responses by male rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**: 791–797.
- Anderson, H.L., Benevenga, N.J. & Harper, A.E. 1969 Effect of cold exposure on the response of rats to a dietary amino acid imbalance. *J. Nutr.* **99**: 184–190.
- Aniento, F., Garcia-España, A., Portolés, M., Alonso, E. & Cabo, J.R. 1988 Effects of inhibition of ornithine aminotransferase or of general aminotransferases on urea and citrulline synthesis and on the levels of acetylglutamate in isolated rat hepatocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **79**: 107–112.

## B

- Baich, A. & Ratzlaff, K. 1980 Ornithine aminotransferase in chick embryo tissues. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **19**: 411–414.
- Barnett, S.A. & Dickson, R.G. 1984 Milk production and consumption and growth of young of wild mice after ten generations in a cold environment. *J. Physiol.* **346**: 409-417.
- Barré, H., Chatonnet, J., Le Maho, Y. & Valatx, J. L. 2001 Physiologie énergétique, *Editions Belin* pp. 399
- Bauwens, J.D., Schmuck, E.G., Lindholm, C.R., Ertel, R.L., Mulligan, J.D., Hovis, I., Viollet, B. & Saupe, K.W. 2011 Cold tolerance, cold-induced hyperphagia, and nonshivering thermogenesis are normal in  $\alpha 1$ -AMPK $^{-/-}$  mice. *Am. J. Physiol.* **301**: R473–R483.
- Beaton, G.H., Beare, J., Ryu, M.H. & McHenry, E.W. 1954 Protein metabolism in the pregnant rat one figure. *J. Nutr.* **54** (2): 291-304.

- Beaudry, J.L. & McClelland, G.B. 2010 Thermogenesis in CD-1 mice after combined chronic hypoxia and cold acclimation. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* **157**: 301–309.
- Benedict, C.R., Fillenz, M. & Stanford, C. 1979 Noradrenaline release in rats during prolonged cold-stress and repeated swim-stress. *Br. J. Pharmacol.* **66**: 521–524.
- Bibbiani, C. & Viola-Magni, M.P. 1971 Catecholamine synthesis and excretion in rats exposed intermittently to cold. *J. Physiol.* **217**: 533–545.
- Bing, C., Frankish, H.M., Pickavance, L., Wang, Q., Hopkins, D.F., Stock, M.J. & Williams, G. 1998 Hyperphagia in cold-exposed rats is accompanied by decreased plasma leptin but unchanged hypothalamic NPY. *Am. J. Physiol.* **274**: R62–R68.
- Boernke, W.E., Stevens, F.J. & Peraino, C. 1981 Effects of self-association of ornithine aminotransferase on its physicochemical characteristics. *Biochemistry* **20** (1): 115–121.
- Boon, L., Geerts, W.J., Jonker, A., Lamers, W.H. & Van Noorden, C.J. 1999 High protein diet induces pericentral glutamate dehydrogenase and ornithine aminotransferase to provide sufficient glutamate for pericentral detoxification of ammonia in rat liver lobules. *Histochem. Cell Biol.* **111**: 445–452.
- Borman, A. & Wood, T.R. 1946 The role of arginine in growth with some observations on the effects of argininic acid. *J. Biol. Chem.* **166** (2): 585–594.
- Bouillaud, F., Ricquier, D., Mory, G. & Thibault, J. 1984 Increased level of mRNA for the uncoupling protein in brown adipose tissue of rats during thermogenesis induced by cold exposure or norepinephrine infusion. *J. Biol. Chem.* **259**: 11583–11586.
- Bradford, M.M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Brennan, P.C., Peraino, C., Fry, R.J.M. & Swick, R.W. 1970 Immunofluorescent localization of ornithine aminotransferase in rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* **18**: 264–267.
- Bulfield, G. & Hall, J.M. 1981 Ornithine aminotransferase levels in rats and mice differ in their response to oestrogen and testosterone. *Comp. Biochem. Physiol., B* **69** (2): 295–297.
- Burch, H.B., Choi, S., McCarthy, W.Z., Wong, P.Y. & Lowry, O.H. 1978 The location of glutamine synthetase within the rat and rabbit nephron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**: 498–505.

## C

- Cain, K. & Skilleter, D.N. 1987 Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: Snell, K. & Mulloock, B. (Ed.) *Biochem. Toxicol.* 217–254. Oxford: IRL Press.
- Canals, M., Rosenmann, M. & Bozinovic, F. 1997 Geometrical aspects of the energetic effectiveness of huddling in small mammals. *Acta theriologica* **42**: 321–328.
- Cannon, B. & Nedergaard, J. 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* **84**: 277–359.

- Cannon, B. & Nedergaard, J. 2011 Nonshivering thermogenesis and its adequate measurement in metabolic studies. *J. Exp. Biol.* **214**: 242–253.
- Chaffee, R.R. & Roberts, J.C. 1971 Temperature acclimation in birds and mammals. *Annu. Rev. Physiol.* **33**: 155-202.
- Cinti, S. 2005 The adipose organ. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **73** (1): 9-15.
- Clarke, S. 1976 A major polypeptide component of rat liver mitochondria: carbamyl phosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* **251**: 950–961.
- Close, R.I. 1972 Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* **52** (1): 129-197.
- Croset, M., Rajas, F., Zitoun, C., Hurot, J.M., Montano, S. & Mithieux, G. 2001 Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* **50**(4): 740–746.
- Cynober, L. & Coudray-Lucas, C. 1995 Urinary urea nitrogen prediction of total urinary nitrogen ». *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* **19** (2): 174

## D

- D'Udine, B. & Gozzo, S. 1983 Archicortex and neocortex in the precocial murid *Acomys cahirinus*. A comparison with two altricial species: *Mus musculus* and *Rattus norvegicus*. *Int. J. Neurosci.* **20**: 255–263.
- Daune, G., Gerhart, F. & Seiler, N. 1988 5-Fluoromethylornithine, an irreversible and specific inhibitor of L-ornithine: 2-oxo-acid aminotransferase. *Biochem. J.* **253**: 481–488.
- Daune, G. & Seiler, N. 1988 Interrelationships between ornithine, glutamate and GABA-III. an ornithine aminotransferase activity that is resistant to inactivation by 5-fluoromethylornithine. *Neurochem. Int.* **13**: 383–391.
- Davis, T.A., Fiorotto, M.L. & Reeds, P.J. 1993 Amino acid compositions of body and milk protein change during the suckling period in rats. *J. Nutr.* **123**: 947–956.
- De Jonge, W.J., Dingemanse, M.A., de Boer, P.A.J., Lamers, W.H. & Moorman, A.F.M. 1998 Arginine-metabolizing enzymes in the developing rat small intestine. *Pediatr. Res.* **43**(4): 442-451.
- Déchaud, H., Lejeune, H., Garoscio-Cholet M., Mallein, R. & Pugeat, M. 1989 Radioimmunoassay of testosterone not bound to sex-steroid-binding protein in plasma. *Clinical chemistry* **35** (8): 1609-1614.
- Drickamer, L.C. 1975 Female mouse maturation: relative importance of social factors and daylength. *J. Reprod. Fertil.* **44**: 147–150.
- Drickamer, L.C. 1983 Mice selected for age of puberty: reverse selection and reproductive characteristics. *Biology of Reproduction* **28**: 843–848.

Dubuc, P.U. 1991 Effects of phenotype, feeding condition and cold exposure on thyrotropin and thyroid hormones of obese and lean mice. *Endocr. Regul.* **25** (3): 171-175.

## F

Filipski, E., King, V.M., Li X.M., Granda, T.G., Mormont, M.C., Liu, X.H., Claustrat, B., Hastings, M.H. & Lévi, F. 2002 Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* **94** (9): 690-697.

Flynn, N.E. & Wu, G. 1996 An important role for endogenous synthesis of arginine in maintaining arginine homeostasis in neonatal pigs. *Am. J. Physiol.* **271**: R1149–1155.

Fregly, M.J., Rossi, F. & Cade, J.R. 1994 A role for thyroid hormones in cold-induced elevation of blood pressure and cardiac hypertrophy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72** (9): 1066-1074.

Fregly, M.J., Rossi, F., Sun, Z., Tümer, N., Cade, J.R., Hegland, D. & Yürekli, M. 1994 Effect of chronic treatment with prazosin and L-arginine on the elevation of blood pressure during cold exposure. *Pharmacology* **49** (6): 351-362.

Fregly, M.J. & Schechtman, O. 1994 Direct blood pressure measurements in rats during abrupt exposure to, and removal from, cold air. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **205** (2): 119-123.

## G

Gebhart, U. B., Maier, T.L., Stevanović, S., Bayer, M.G. & Schenk, H.E. 1992 Ferredoxin:NADP oxidoreductase of cyanophora paradoxa: Purification, partial characterization, and N-terminal amino acid sequence. *Protein Expr. Purif.* **3** (3): 228-235.

Gilbert, C., McCafferty, D., Le Maho, Y., Martrette, J., Giroud, S., Blanc, S. & Ancel, A. 2010 One for all and all for one: the energetic benefits of huddling in endotherms. *Biological reviews* **85**: 545–569.

Goglia, F., Liverini, G., Leo, T.D. & Barletta, A. 1983 Thyroid state and mitochondrial population during cold exposure. *Pflugers Arch.* **396**: 49–53.

Gomez, F. & Dallman, M.F. 2001 Manipulation of androgens causes different energetic responses to cold in 60- and 40-day-old male rats. *Am. J. Physiol.* **280**: R262–R273.

Greco-Perotto, R., Zaninetti, D., Assimacopoulos-Jeannet, F., Bobbioni, E. & Jeanrenaud, B. 1987 Stimulatory effect of cold adaptation on glucose utilization by brown adipose tissue. Relationship with changes in the glucose transporter system. *J. Biol. Chem.* **262**: 7732–7736.

Greengard, O. & Herzfeld, A. 1977 The undifferentiated enzymic composition of human fetal lung and pulmonary tumors. *Cancer Res.* **37**: 884–891.

## H

- Hadj-Sahraoui, N., Seugnet, I., Ghorbel, M.T. & Demeneix, B. 2000 Hypothyroidism prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. *Neurosci. Lett.* **280** (2): 79-82.
- Halvorson, I., Gregor, L. & Thornhill, J.A. 1990 Brown adipose tissue thermogenesis is activated by electrical and chemical (l-glutamate) stimulation of the ventromedial hypothalamic nucleus in cold-acclimated rats. *Brain Res.* **522** (1): 76-82.
- Hayasaka, S., Shiono, T., Takaku, Y. & Mizuno, K. 1980 Ornithine ketoacid aminotransferase in the bovine eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **19**: 1457-1460.
- Heinlein, C.A. & Chang, C. 2002 The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol. Endocrinol.* **16** (10): 2181-2187.
- Hellerstein, M.K., Schwarz, J.M. & Neese, R.A. 1996 Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans. *Annu. Rev. Nutr.* **16**: 523-557.
- Herzfeld, A. & Greengard, O. 1969 Endocrine modification of the developmental formation of ornithine aminotransferase in rat tissues. *J. Biol. Chem.* **244**: 4894-4898.
- Herzfeld, A. & Knox, W.E. 1968 The properties, developmental formation, and estrogen induction of ornithine aminotransferase in rat tissues. *J. Biol. Chem.* **243**: 3327-3332.
- Herzfeld, A., Mezl, V.A. & Knox, W.E. 1977 Enzymes metabolizing delta1-pyrroline-5-carboxylate in rat tissues. *Biochem. J.* **166** (1): 95-103.
- Herzfeld, A. & Raper, S.M. 1976a Amino acid metabolizing enzymes in rat submaxillary gland, normal or neoplastic, and in pancreas. *Enzyme* **21**: 471-480.
- Herzfeld, A. & Raper, S.M. 1976b Enzymes of ornithine metabolism in adult and developing rat intestine. *Biochim. Biophys. Acta* **428**: 600-610.
- Himms-Hagen, J. 1972 Lipid metabolism during cold-exposure and during cold-acclimation. *Lipids* **7**: 310-323.
- Himms-Hagen, J. 1985 Brown adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Annu. Rev. Nutr.* **5**: 69-94.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. & Gelfand, D.H. 1991 Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 7276-7280.
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D.L., Katsu, Y., Watanabe, H. & Iguchi, T. 2002 Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reproductive Toxicology* **16**: 117-122.
- Hue, L. 2001 Regulation of neoglucogenesis in liver. The endocrine pancreas and regulation of metabolism. *O.U. Press.* **II**: 649-657.
- Hunter, J.E. & Harper, A.E. 1977 Induction of pyridoxal phosphate-dependent enzymes in vitamin B-6 deficient rats. *J. Nutr.* **107**: 235-244.

## I

- Iakovlev, N.N. 1979 Ornithine metabolism and adaptation to increased muscular activity. *Fiziologicheskii zhurnal SSSR imeni I. M. Sechenova* **65** (7): 979-984.
- Ikemoto, H., Hiroshige, T. & Ito, S. 1967 Oxygen consumption of brown adipose tissue in normal and hypothyroid mice. *Jpn. J. Physiol.* **17** (5): 516-522.
- Inana, G., Totsuka, S., Redmond, M., Dougherty, T., Nagle, J., Shiono, T., Ohura, T., Kominami, E. & Katunuma, N. 1986 Molecular cloning of human ornithine aminotransferase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 1203-1207.
- Ip, M.M., Chee, P.Y. & Swick, R.W. 1974 Turnover of hepatic mitochondrial ornithine aminotransferase and cytochrome oxidase using (14C)carbonate as tracer. *Biochim. Biophys. Acta* **354**: 29-38.
- IUPS Thermal Commission 2001 Glossary of terms for thermal physiology. *Jpn. J. Physiol.* **51**: 245-278

## J

- Johnson, M.S., Thomson, S.C. & Speakman, J.R. 2001 Limits to sustained energy intake. I. Lactation in the laboratory mouse *Mus musculus*. *J. Exp. Biol.* **204** (11): 1925-1935.
- Jones, M.E. 1985 Conversion of glutamate to ornithine and proline: Pyrroline-5-carboxylate, a possible modulator of arginine requirements. *J. Nutr.* **115**: 509-515.
- Jones, M.E., Anderson, A.D., Anderson, C. & Hodes, S. 1961 Citrulline synthesis in rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* **95**: 499-507.
- Jung, M.J. & Seiler, N. 1978 Enzyme-activated irreversible inhibitors of L-ornithine:2-oxoacid aminotransferase. Demonstration of mechanistic features of the inhibition of ornithine aminotransferase by 4-aminohept-5-ynoic acid and gabaculine and correlation with *in vivo* activity. *J. Biol. Chem.* **253**: 7431-7439.
- Jungermann, K. & Katz, N. 1989 Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol. Rev.* **69** (3): 708-764.

## K

- Kasahara, M., Matsuzawa, T., Kokubo, M., Gushiken, Y., Tashiro, K., Koide, T., Watanabe, H. & Katunuma, N. 1986 Immunohistochemical localization of ornithine aminotransferase in normal rat tissues by Fab'-horseradish peroxidase conjugates. *J. Histochem. Cytochem.* **34**: 1385-1388.
- Katunuma, N., Matsuda, Y. & Tomino, I. 1964 Studies on ornithine-ketoacid transaminase. *J. Biochem.* **56**: 499-503.
- Kekomäki, M., Rahiala, E.L. & Rähkä, N.C. 1969 Canaline: interfering with ornithine metabolism in the isolated perfused rat liver. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* **47**: 33-38.



- Kito, K., Sanada, Y. & Katunuma, N. 1978 Mode of inhibition of ornithine aminotransferase by L-canaline. *J. Biochem.* **83**: 201–206.
- Klain, G.J., Vaughan, D.A. & Vaughan, L.N. 1963 Effect of protein intake and cold exposure on selected liver enzymes associated with amino acid metabolism. *J. Nutr.* **80**: 107–110.
- Kobayashi, K., Miyazawa, S. & Endo, A. 1977 Isolation and inhibitory activity of gabaculine, a new potent inhibitor of gamma-aminobutyrate aminotransferase produced by a *Streptomyces*. *FEBS Lett.* **76**: 207–210.
- Kobayashi, K., Morris, H.P. & Katunuma, N. 1976 Studies on the turnover rates of ornithine aminotransferase in Morris hepatoma 44 and host liver. *J. Biochem.* **80**: 1085–1089.
- Kobayashi, T., Nishii, M., Takagi, Y., Titani, K. & Matsuzawa, T., 1989 Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of mRNA for human kidney ornithine aminotransferase. An examination of ornithine aminotransferase isozymes between liver and kidney. *FEBS Lett.* **255**: 300–304.
- Kobayashi, T., Ogawa, H., Kasahara, M., Shiozawa, Z. & Matsuzawa, T. 1995 A single amino acid substitution within the mature sequence of ornithine aminotransferase obstructs mitochondrial entry of the precursor. *Am. J. Hum. Genet.* **57**: 284–291.
- Kong, D., Tong, Q., Ye, C., Koda Fuller, P.M., Krashes, M.J., Vong, L., Ray, R.S., Olson, D.P. & Lowell, B.B. 2012 GABAergic RIP-Cre neurons in the arcuate nucleus selectively regulate energy expenditure. *Cell* **151**(3): 645–657.
- Kowalchuk, J.M., Curi, R. & Newsholme, E.A. 1988 Glutamine metabolism in isolated incubated adipocytes of the rat. *Biochem. J.* **249** (3): 705–708.
- Krebs, H.A. & Henseleit, K., 1932 Untersuchungen über die harnstoffbildung im tierkörper. II. *J. Mol. Med.* **11**: 1137–1139.
- Kumar, R.H., Ananda, S., Devaraju, K.S., Prakash, B.M., Sampath Kumar, S., Suresh Babu, S.V., Ramachandraswamy, N. & Puttaraju, H.P. 2009 A sensitive assay for ornithine amino transferase in rat brain mitochondria by ninhydrin method. *Indian J. Clin. Biochem.* **24**: 275–279.
- Kuo, C.F. & Darnell, J.E.Jr 1989 Mouse glutamine synthetase is encoded by a single gene that can be expressed in a localized fashion. *J. Mol. Biol.* **208**: 45–56.
- Kuo, F.C. & Darnell, J.E. 1991 Evidence that interaction of hepatocytes with the collecting (hepatic) veins triggers position-specific transcription of the glutamine synthetase and ornithine aminotransferase genes in the mouse liver. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 6050–6058.
- Kuo, F.C., Hwu, W.L., Valle, D. & Darnell, J.E. 1991 Colocalization in pericentral hepatocytes in adult mice and similarity in developmental expression pattern of ornithine aminotransferase and glutamine synthetase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 9468–9472.
- Kuroshima, A. & Doi, K. 1976 Is glucagon involved in cold acclimatization? *Experientia* **32**: 473–474.

Kuroshima, A., Doi, K. & Ohno, T. 1978 Role of glucagon in metabolic acclimation to cold and heat. *Life Sciences* **23**: 1405–1409.

## L

Lamers, W.H., Mooren, P.G., Graaf, A. & Charles, R. 2005 Perinatal development of the liver in rat and spiny mouse. *Eur. J. Biochem.* **146**: 475–480.

Lee, N.K.L. & MacLean, H.E. 2011 Polyamines, androgens, and skeletal muscle hypertrophy. *J. Cell. Physiol.* **226** (6): 1453-1460.

Leppäluoto, J., Pääkkönen, T., Korhonen, I. & Hassi, J. 2005 Pituitary and autonomic responses to cold exposures in man. *Acta Physiologica Scandinavica* **184**: 255–264.

Levillain, O., Balvay, S. & Peyrol, S. 2005a Mitochondrial expression of arginase II in male and female rat inner medullary collecting ducts. *J. Histochem. Cytochem.* **53**: 533–541.

Levillain, O., Déglétagne, C., Letexier, D. & Déchaud, H. 2011 Orchidectomy upregulates while testosterone treatment downregulates the expression of ornithine aminotransferase gene in the mouse kidney. *Endocrinology book* **3**: 115-132.

Levillain, O., Diaz, J.-J., Blanchard, O. & Déchaud, H. 2005b Testosterone down-regulates ornithine aminotransferase gene and up-regulates arginase II and ornithine decarboxylase genes for polyamines synthesis in the murine kidney. *Endocrinol.* **146**: 950–959.

Levillain, O., Diaz, J.J., Reymond, I. & Soulet, D. 2000 Ornithine metabolism along the female mouse nephron: localization of ornithine decarboxylase and ornithine aminotransferase. *Pflugers Arch.* **440**: 761–769.

Levillain, O., Hus-Citharel, A., Garvi, S., Peyrol, S., Reymond, I., Mutin, M. & Morel, F. 2004 Ornithine metabolism in male and female rat kidney: Mitochondrial expression of ornithine aminotransferase and arginase II. *Am. J. Physiol.* **286**: F727–F738.

Levillain, O., Rabier, D., Duclos, B., Gaudreau, P. & Vinay, P. 2008 L-arginine metabolism in dog kidney and isolated nephron segments. *Metab. Clin. Exp.* **57**: 9–23.

Levillain, O., Ventura, G., Déchaud, H., Hobeika, M., Meseguer, A., Moinard, C. & Cynober, L. 2007 Sex-differential expression of ornithine aminotransferase in the mouse kidney. *Am. J. Physiol.* **292**: F1016–F1027.

Lie-Venema, H., De Boer, P.A., Moorman, A.F. & Lamers, W.H. 1997 Role of the 5' enhancer of the glutamine synthetase gene in its organ-specific expression. *Biochem. J.* **323**: 611–619.

Lim, S.N., Rho, H.W., Park, J.W., Jhee, E.C., Kim, J.S. & Kim, H.R. 1998 A variant of ornithine aminotransferase from mouse small intestine. *Exp. Mol. Med.* **30**: 131–135.

- Lin, C.Y., Lin, M.T., Cheng, R.T. & Chen, S.H. 2010 Testosterone depletion by castration may protect mice from heat-induced multiple organ damage and lethality. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W. & Deetz, K. 1995 Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res.* **4** (6): 357-362.
- López-Soriano, F.J. & Alemany, M. 1986 Amino-acid metabolism enzyme activities in rat white adipose tissue. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **94**: 121–125.
- López-Soriano, F.J. & Alemany, M. 1987 Effect of cold-temperature exposure and acclimation on amino acid pool changes and enzyme activities of rat brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **925**: 265–271.
- López-Soriano, F.J. & Alemany, M. 1988 Influence of cold exposure on liver amino acid metabolism enzymes of the rat. *Biochem. Int.* **16**: 1075–1081.
- López-Soriano, F.J., Fernández-López, J.A., Mampel, T., Villarroya, F., Iglesias, R. & Alemany, M. 1988 Amino acid and glucose uptake by rat brown adipose tissue. Effect of cold-exposure and acclimation. *Biochem. J.* **252** (3): 843-849.
- Lu, T.-S. & Mazelis, M. 1975 L-Ornithine:2-oxoacid aminotransferase from squash (*Cucurbita pepo*, L.) Cotyledons. *Plant Physiol.* **55**: 502–506.
- Lünsdorf, H., Hecht, H.-J. & Tsai, H. 2005 High-resolution electron microscopic studies on the quaternary structure of ornithine aminotransferase from pig kidney. *Eur. J. Biochem.* **225**: 205–211.
- Lyons, R.T. & Pitot, H.C., 1976 The regulation of ornithine aminotransferase synthesis by glucagon in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **174**: 262–272.
- Lyons, R.T. & Pitot, H.C. 1977 Hormonal regulation of ornithine aminotransferase biosynthesis in rat liver and kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **180**: 472–479.

## M

- Mallette, L.E., Exton, J.H. & Park, C.R. 1969 Control of gluconeogenesis from amino acids in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **244** (20): 5713-5723.
- Manteuffel-Cymborowska, M., Chmurzyńska, W., Peska, M. & Grzelakowska-Sztabert, B. 1995 Arginine and ornithine metabolizing enzymes in testosterone-induced hypertrophic mouse kidney. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**: 287–295.
- Markova, M., Peneff, C., Hewlins, M.J.E., Schirmer, T. & John, R.A. 2005 Determinants of substrate specificity in  $\omega$ -aminotransferases. *J. Biol. Chem.* **280**: 36409–36416.
- Marković-Housley, Z., Kania, M., Lustig, A., Vincent, M.G., Jansonius, J.N. & John, R.A. 1987 Quaternary structure of ornithine aminotransferase in solution and preliminary crystallographic data. *Eur. J. Biochem.* **162**: 345–350.

- Matsuzawa, T., Kobayashi, T., Tashiro, K. & Kasahara, M. 1994 Changes in ornithine metabolic enzymes induced by dietary protein in small intestine and liver: intestine-liver relationship in ornithine supply to liver. *J. Biochem.* **116**: 721–727.
- McKnight, J.R., Satterfield, M.C., Jobgen, W.S., Smith, S.B., Spencer, T.E., Meininger, C.J., McNeal, C.J. & Wu, G. 2010 Beneficial effects of L-arginine on reducing obesity: Potential mechanisms and important implications for human health. *Amino Acids* **39** (2): 349-357.
- Mefferd, R.B Jr., Hale, H.B. & Martens, H.H. 1958 Nitrogen and electrolyte excretion of rats chronically exposed to adverse environments. *Am. J. Physiol.* **192** (1): 209-218.
- Meier, H., Hoag W.G., McBurney J.J. & Myers, D.D. 1967 Chemical characterization of inbred strain mouse milk. II. Total fatty acids and fatty acid analyses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **124** (2): 633-636.
- Meijer, D.K., Mol, W.E., Müller, M. & Kurz, G. 1990 Carrier-mediated transport in the hepatic distribution and elimination of drugs, with special reference to the category of organic cations. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **18** (1): 35-70.
- Melander, A. & Rerup, C. 1968 Studies on the thyroid activity in the mouse. *Acta Endocrinologica* **58** (2): 202-214.
- Merrill, M.J., Mueckler, M.M. & Pitot, H.C. 1985 Levels of ornithine aminotransferase messenger RNA under conditions of cyclic AMP induction in cultured hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **260**: 11248–11251.
- Mezl, V.A. & Knox, W.E. 1977 Metabolism of arginine in lactating rat mammary gland. *Biochem. J.* **166**: 105–113.
- Millican, P.E., Vernon, R.G. & Pain, V.M. 1987 Protein metabolism in the mouse during pregnancy and lactation. *Biochem. J.* **248** (1): 251-257.
- Milner, J.A., Wakeling A.E. & Visek, W.J. 1974 Effect of arginine deficiency on growth and intermediary metabolism in rats. *J. Nutr.* **104** (12): 1681-1689.
- Mineo, P.M., Cassell, E.A., Roberts, M.E. & Schaeffer, P.J. 2012 Chronic cold acclimation increases thermogenic capacity, non-shivering thermogenesis and muscle citrate synthase activity in both wild-type and brown adipose tissue deficient mice. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **161** (4): 395-400.
- Mitchell, G.A., Looney, J.E., Brody, L.C., Steel, G., Suchanek, M., Engelhardt, J.F., Willard, H.F. & Valle, D. 1988 Human ornithine-delta-aminotransferase. cDNA cloning and analysis of the structural gene. *J. Biol. Chem.* **263**: 14288–14295.
- Mithieux, G. 2001 New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **4**(4): 267-271.
- Miyanaka, K., Gotoh, T., Nagasaki, A., Takeya, M., Ozaki, M., Iwase, K., Takiguchi, M., Iyama, K.I., Tomita, K. & Mori, M. 1998 Immunohistochemical localization of arginase II and other enzymes of arginine metabolism in rat kidney and liver. *Histochem. J.* **30**: 741–751.

- Morris, S.M.Jr 2006 Arginine: beyond protein. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**: 508S–512S.
- Morrison, S.F., Nakamura, K. & Madden, C.J. 2008 Central control of thermogenesis in mammals. *Exp. Physiol.* **93**: 773–797.
- Moshkin, M.P., Potapov, M.A., Frolova, O.F. & Evsikov, V.I. 1993 Changes in aggressive behavior, thermoregulation, and endocrine responses in BALB/cLac and C57Bl/6J mice under cold exposure. *Physiol. Behav.* **53**: 535–538.
- Mozo, J., Emre, Y., Bouillaud, F., Ricquier, D. & Criscuolo, F. 2005 Thermoregulation: what role for UCPs in mammals and birds? *Biosci. Rep.* **25**: 227–249.
- Mueckler, M.M., Himeno, M. & Pitot, H.C. 1982 *In vitro* synthesis and processing of a precursor to ornithine aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **257**: 7178–7180.
- Mueckler, M.M., Merrill, M.J. & Pitot, H.C. 1983 Translational and pretranslational control of ornithine aminotransferase synthesis in rat liver. *J. Biol. Chem.* **258**: 6109–6114.
- Mueckler, M.M., Moran, S. & Pitot, H.C. 1984 Transcriptional control of ornithine aminotransferase synthesis in rat kidney by estrogen and thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* **259**: 2302–2305.
- Mueckler, M.M. & Pitot, H.C. 1983 Regulation of ornithine aminotransferase mRNA levels in rat kidney by estrogen and thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* **258**: 1781–1784.
- Mueckler, M.M. & Pitot, H.C. 1985 Sequence of the precursor to rat ornithine aminotransferase deduced from a cDNA clone. *J. Biol. Chem.* **260**: 12993–12997.

## N

- Nada, A.M.K., Abd-Elhalim, H.M., El-Domyati, F.M., Abou-Ali, R.M.I. & Bahieldin, A. 2010 Expression, detection of candidate function and homology modeling for *Vicia villosa* ornithine  $\delta$ -aminotransferase. *GM Crops* **1**: 250–256.
- Naismith, D.J. & Morgan, B.L. 1976 The biphasic nature of protein metabolism during pregnancy in the rat. *Br. J. Nutr.* **36** (3): 563–566.
- Nakagawa, H. & Nagai, K. 1971 Cold adaptation. I. Effect of cold-exposure on gluconeogenesis. *J. Biochem.* **69**: 923–934.
- Nakajima, K. & Ishikawa, E. 1971 Hormonal and dietary control of enzymes in the rat. 3. The regulation of liver serine dehydratase and ornithine delta-aminotransferase in hypophysectomized-pancreatectomized rats. *J. Biochem.* **69**: 829–837.
- Nelson, C.C., Hendy, S.C., Shukin, R.J., Cheng, H., Bruchovsky, N., Koop, B.F. & Rennie, P.S. 1999 Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: Evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol. Endocrinol.* **13** (12): 2090–2107.
- Nicolaysen, A., Gammelsaeter, R., Storm-Mathisen, J., Gundersen, V. & Ole Iversen, P. 2007 The components required for amino acid neurotransmitter signaling are present in adipose tissues. *J. Lipid Res.* **48** (10): 2123–2132.

Nikami, H., Shimizu, Y., Endoh, D., Yano, H. & Saito, M. 1992 Cold exposure increases glucose utilization and glucose transporter expression in brown adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**: 1078–1082.

## O

O'Donnell, J.J., Sandman, R.P. & Martin, S.R. 1977 Deficient L-ornithine: 2-oxoacid aminotransferase activity in cultured fibroblasts from a patient with gyrate atrophy of the retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**: 396–399.

O'Donnell, J.J., Vannas-Sulonen, K., Shows, T.B. & Cox, D.R. 1988 Gyrate atrophy of the choroid and retina: assignment of the ornithine aminotransferase structural gene to human chromosome 10 and mouse chromosome 7. *Am. J. Hum. Genet.* **43**(6): 922–928.

O'Sullivan, D., Brosnan, J.T. & Brosnan, M.E. 1998 Hepatic zonation of the catabolism of arginine and ornithine in the perfused rat liver. *Biochem. J.* **330** ( Pt 2): 627–632.

Ohura, T., Kominami, E., Tada, K. & Katunuma, N. 1982 Crystallization and properties of human liver ornithine aminotransferase. *J. Biochem.* **92**: 1785–1792.

Oriol-Audit, C. 1978 Polyamine-induced actin polymerization. *Eur. J. Biochem.* **87** (2): 371–376.

Oyama, R., Suzuki, M., Matsuzawa, T. & Titani, K., 1990 Complete amino acid sequence of rat kidney ornithine aminotransferase: identity with liver ornithine aminotransferase. *J. Biochem.* **108**: 133–138.

Ozaki, M., Gotoh, T., Nagasaki, A., Miyanaka, K., Takeya, M., Fujiyama, S., Tomita, K. & Mori, M. 1999 Expression of arginase II and related enzymes in the rat small intestine and kidney. *J. Biochem.* **125**: 586–593.

## P

Patterson, B.W., Horowitz, J.F., Wu, G., Watford, M., Coppack, S.W. & Klein, S. 2002 Regional muscle and adipose tissue amino acid metabolism in lean and obese women. *Am. J. Physiol.* **282** (4): E931–936.

Peraino, C., Bunville, L.G. & Tahmisian, T.N. 1969 Chemical, physical, and morphological properties of ornithine aminotransferase from rat liver. *J. Biol. Chem.* **244**: 2241–2249.

Peraino, C. & Pitot, H.C. 1963 Ornithine- $\delta$ -transaminase in the rat I. Assay and some general properties. *Biochim. Biophys. Acta* **73**: 222–231.

Peraino, C. & Pitot, H.C. 1964 Studies on the induction and repression of enzymes in rat liver II. Carbohydrate repression of dietary and hormonal induction of threonine dehydrase and ornithine  $\delta$ -transaminase. *J. Biol. Chem.* **239**: 4308–4313.

Pitot, H.C. & Peraino, C. 1963 Carbohydrate repression of enzyme induction in rat liver. *J. Biol. Chem.* **238**: 1910–1912.



Poll, M.C. van de, Siroen, M.P., Leeuwen, P.A. van, Soeters, P.B., Melis, G.C., Boelens, P.G., Deutz, N.E. & Dejong, C.H. 2007 Interorgan amino acid exchange in humans: consequences for arginine and citrulline metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**: 167–172.

Portet, R. 1983 Le tissu adipeux brun. *Pour la science*. **4**: 54-71.

## R

Rabi, T., Cassuto, Y. & Gutman, A. 1977 Lipolysis in brown adipose tissue of cold- and heat-acclimated hamsters. *J. Appl. Physiol.* **43**: 1007–1011.

Ragland, W.L. & Pitot, H.C. 1971 Enzymes of carbohydrate and amino acid metabolism in liver, brain and kidney of *Macaca mulatta*. *Experientia* **27**: 1023.

Räihä, N.C.R. & Kekomäki, M.P. 1968 Studies on the development of ornithine–keto acid aminotransferase activity in rat liver. *Biochem. J.* **108**: 521–525.

Ramesh, V., Cheng, S.V., Kozak, C.A., Herron, B.J., Shih, V.E., Taylor, B.A. & Gusella, J.F. 1992 Mapping of ornithine aminotransferase gene sequences to mouse chromosomes 7, X, and 3. *Mamm. Genome* **3**(1): 17-22.

Ramesh, V., Benoit, L.A., Crawford, P., Harvey, P.T., Shows, T.B., Shih, V.E. & Gusella J.F. 1988 The ornithine aminotransferase (OAT) locus: analysis of RFLPs in gyrate atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **42**(2): 365-372.

Reyes, A.A., Karl, I.E. & Klahr, S. 1994 Role of arginine in health and in renal disease. *Am. J. Physiol.* **267** (3 Pt 2): F331-346.

Riby, J.E., Hurwitz, R.E. & Kretchmer, N. 1990 Development of ornithine metabolism in the mouse intestine. *Pediatr. Res.* **28**: 261–265.

Roosens, N.H.C.J., Thu, T.T., Iskandar, H.M. & Jacobs, M. 1998 Isolation of the ornithine- $\delta$ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **117**: 263–271.

Rosenthal, G.A. & Dahlman, D.L. 1990 Interaction of L-canaline with ornithine aminotransferase of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (Sphingidae). *J. Biol. Chem.* **265**: 868–873.

Ross, G., Dunn, D. & Jones, M.E. 1978 Ornithine synthesis from glutamate in rat intestinal mucosa homogenates: Evidence for the reduction of glutamate to  $\gamma$ -glutamyl semialdehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**: 140–147.

## S

Sanada, Y., Suemori, I. & Katunuma, N. 1970 Properties of ornithine aminotransferase from rat liver, kidney and small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* **220**: 42–50.

Scher, W.I. & Vogel, H.J. 1957 Occurrence of ornithine  $\delta$ -transaminase: a dichotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **43**: 796–803.

- Seiler, N. 2000 Ornithine aminotransferase, a potential target for the treatment of hyperammonemias. *Curr. Drug Targets* **1**: 119–153.
- Seiler, N., Sarhan, S. & Knödgen, B. 1992 Inhibition of ornithine aminotransferase by 5-fluoromethylornithine: protection against acute thioacetamide intoxication by elevated tissue ornithine levels. *Pharmacol. Toxicol.* **70**: 373–380.
- Seitz, H.J., Krone, W., Wilke, H. & Tarnowski, W. 1981 Rapid rise in plasma glucagon induced by acute cold exposure in man and rat. *Pflugers Arch.* **389**: 115–120.
- Shah, S.A., Shen, B.W. & Brünger, A.T. 1997 Human ornithine aminotransferase complexed with L-canaline and gabaculine: structural basis for substrate recognition. *Structure* **5**: 1067–1075.
- Shambaugh, G.E. 1977 Urea biosynthesis I. The urea cycle and relationships to the citric acid cycle. *Am. J. Clin. Nutr.* **30**: 2083–2087.
- Shen, B.W., Hennig, M., Hohenester, E., Jansonius, J.N. & Schirmer, T. 1998 Crystal structure of human recombinant ornithine aminotransferase. *J. Mol. Biol.* **277**: 81–102.
- Shiono, T., Hayasaka, S. & Mizuno, K. 1982 Development of ornithine ketoacid aminotransferase in rabbit ocular tissues and liver. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **23**: 419–424.
- Shiota, M., Inagami, M., Fujimoto, Y., Moriyama, M., Kimura, K. & Sugano, T. 1995 Cold acclimation induces zonal heterogeneity in gluconeogenic responses to glucagon in rat liver lobule. *Am. J. Physiol.* **268**: E1184–1191.
- Shiota, M., Tanaka, T. & Sugano, T. 1985 Effect of norepinephrine on gluconeogenesis in perfused livers of cold-exposed rats. *Am. J. Physiol.* **249**: E281–286.
- Shull, J.D., Esumi, N., Colwell, A.S., Pennington, K.L. & Jendoubi, M. 1995a Sequence of the promoter region of the mouse gene encoding ornithine aminotransferase. *Gene* **162**: 275–277.
- Shull, J.D., Pennington, K.L., Gurr, J.A. & Ross, A.C. 1995b Cell-type specific interactions between retinoic acid and thyroid hormone in the regulation of expression of the gene encoding ornithine aminotransferase. *Endocrinol.* **136**: 2120–2126.
- Simmaco, M., John, R.A., Barra, D. & Bossa, F. 1986 The primary structure of ornithine aminotransferase: Identification of active-site sequence and site of post-translational proteolysis. *FEBS Lett.* **199**(1): 39–42.
- Simell, O. & Takki, K. 1973 Raised plasma-ornithine and gyrate atrophy of the choroid and retina. *The Lancet* **301**: 1031–1033.
- Sipilä, I., Simell, O. & O'Donnell, J.J. 1981 Gyrate atrophy of the choroid and retina with hyperornithinemia: characterization of mutant liver L-ornithine:2-oxoacid aminotransferase kinetics. *J. Clin. Invest.* **67**: 1805–1807.
- Smith, R.E. & Horwitz, B.A. 1969 Brown fat and thermogenesis. *Physiol. Rev.* **49**: 330–425.



- Soulet, D. & Rivest, S. 2003 Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system. *J. Cell Biol.* **162**(2): 257-268.
- Stoner, H.B. 1971 Effect of injury on shivering thermogenesis in the rat. *J. Physiol.* **214**: 599–615.
- Storici, P., Capitani, G., Müller, R., Schirmer, T. & Jansonius, J.N. 1999 Crystal structure of human ornithine aminotransferase complexed with the highly specific and potent inhibitor 5-fluoromethylornithine. *J. Mol. Biol.* **285**: 297–309.
- Strecker, H.J. 1965 Purification and properties of rat liver ornithine  $\Delta$ -transaminase. *J. Biol. Chem.* **240**(3): 1225-1230.
- Sztul, E.S., Chu, T.W., Strauss, A.W. & Rosenberg, L.E. 1988 Import of the malate dehydrogenase precursor by mitochondria. Cleavage within leader peptide by matrix protease leads to formation of intermediate-sized form. *J. Biol. Chem.* **263**: 12085–12091.
- Sztul, E.S., Hendrick, J.P., Kraus, J.P., Wall, D., Kalousek, F. & Rosenberg, L.E. 1987 Import of rat ornithine transcarbamylase precursor into mitochondria: two-step processing of the leader peptide. *J. Cell. Biol.* **105**: 2631–2639.

## T

- Takki, K. & Simell, O. 1974 Genetic aspects in gyrate atrophy of the choroid and retina with hyperornithinaemia. *Br. J. Ophthalmol.* **58**: 907–916.
- Tan, B., Li, X., Yin, Y., Wu, Z., Liu, C., Tekwe, C.D. & Wu, G. 2012 Regulatory roles for L-arginine in reducing white adipose tissue. *Front. Biosci.* **17**: 2237-2246.
- Therrien, G., Sarhan, S., Knödgen, B., Butterworth, R.F. & Seiler, N. 1994 Effects of ornithine aminotransferase inactivation by 5-fluoromethylornithine in rats following portacaval anastomosis. *Metab. Brain Dis.* **9**: 211–224.
- Thomas, T. & Thomas, T.J. 2001 Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**(2): 244-258.
- Tomino, I., Katunuma, N., Morris, H.P. & Weber, G. 1974 Imbalance in ornithine metabolism in hepatomas of different growth rates as expressed in behavior of L-ornithine:2-oxoacid aminotransferase (Ornithine Transaminase, EC 2.6.1.13). *Cancer Res.* **34**: 627–636.
- Tse, C. & Capeau, J. 2003 Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **61** (3): 279-293.

## U

- Uchida, Y. 1979 Effects of chlorpromazine on lipolysis in brown and white adipose tissues of cold-exposed rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **29**: 587–596.

## V

- Valle, D., Kaiser-Kupfer, M.I. & Del Valle, L.A. 1977 Gyrate atrophy of the choroid and retina: deficiency of ornithine aminotransferase in transformed lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5159–5161.
- Valle, D.L., Boison, A.P., Jezyk, P. & Aguirre, G. 1981 Gyrate atrophy of the choroid and retina in a cat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **20**: 251–255.
- Vandewater, L.J. & Henning, S.J. 1985 Role of thyroxine in the postnatal development of rat hepatic tryptophan oxygenase and ornithine aminotransferase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **179** (1): 83–89.
- Ventura, G., De Bandt, J.-P., Segaud, F., Perret, C., Robic, D., Levillain, O., Le Plenier, S., Godard, C., Cynober, L. & Moinard, C. 2009 Overexpression of ornithine aminotransferase: consequences on amino acid homeostasis. *Br. J. Nutr.* **101**: 843–851.
- Ventura, G., Moinard, C., Segaud, F., Le Plenier, S., Cynober, L. & De Bandt, J.P. 2010 Adaptative response of nitrogen metabolism in early endotoxemia: role of ornithine aminotransferase. *Amino Acids* **39**: 1417–1426.
- Verrijdt, G., Haelens, A. & Claessens, F. 2003 Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. *Mol. Genet. Metab.* **78** (3): 175–185.
- Visek, W.J. 1986 Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation ». *J. Nutr.* **116** (1): 36–46.
- Volpe, P., Menna, T. & Pagano, G. 1974 Ornithine-delta-transaminase heterogeneity and regulation. Sequential expression of the "Liver" and "Kidney" enzyme forms during the HeLa Cell cycle. *Eur. J. Biochem.* **44**(2): 455–458.
- Volpe, P., Sawamura, R. & Strecker, H.J. 1969 Control of ornithine  $\delta$ -transaminase in rat liver and kidney. *J. Biol. Chem.* **244**: 719–726.

## W

- Wakabayashi, Y., Yamada, E., Hasegawa, T. & Yamada, R. 1991 Enzymological evidence for the indispensability of small intestine in the synthesis of arginine from glutamate. I. Pyrroline-5-carboxylate synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **291**: 1–8.
- Wallace, H.M., Fraser, A.V. & Hughes, A. 2003 A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* **376** (Pt 1): 1–14.
- Walters, T.J. & Constable, S.H. 1993 Intermittent cold exposure causes a muscle-specific shift in the fiber type composition in rats. *J. Appl. Physiol.* **75** (1): 264–267.
- Wang, T., Lawler, A.M., Steel, G., Sipila, I., Milam, A.H. & Valle, D. 1995 Mice lacking ornithine-delta-aminotransferase have paradoxical neonatal hypoornithinaemia and retinal degeneration. *Nat. Genet.* **11**: 185–190.

- Wichmann, M.W., Zellweger, R., DeMaso, C.M., Ayala, A. & Chaudry, I.H. 1996 Mechanism of immunosuppression in males following trauma-hemorrhage. Critical role of testosterone. *Arch. Surg.* **131** (11): 1186-1191.
- Windmueller, H.G. & Spaeth, A.E. 1974 Uptake and metabolism of plasma glutamine by the small intestine. *J. Biol. Chem.* **249**: 5070–5079.
- Windmueller, H.G. & Spaeth, A.E. 1980 Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. *J. Biol. Chem.* **255**: 107–112.
- Wong, P.T., McGeer, E.G. & McGeer, P.L. 1981 A sensitive radiometric assay for ornithine aminotransferase: regional and subcellular distributions in rat brain. *J. Neurochem.* **36**: 501–505.
- Wroblewski, J.T., Blaker, W.D. & Meek, J.L. 1985 Ornithine as a precursor of neurotransmitter glutamate: effect of canaline on ornithine aminotransferase activity and glutamate content in the septum of rat brain. *Brain Res.* **329**: 161–168.
- Wu, C. 1979 Estrogen receptor translocation and ornithine aminotransferase induction by estradiol in rat kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**: 769–776.
- Wu, G., Bazer, F.W., Davis, T.A., Kim, S.W., Li, P., Rhoads, J.M., Satterfield, M.C., Smith, S.B., Spencer, T.E. & Yin, Y. 2009 Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* **37** (1): 153-168.
- Wu, G., Knabe, D.A. & Flynn, N.E. 1994 Synthesis of citrulline from glutamine in pig enterocytes. *Biochem. J.* **299** ( Pt 1): 115-121.
- Wu, X., Arumugam, R., Zhang, N. & Lee, M.M. 2010 Androgen profiles during pubertal Leydig cell development in mice. *Reproduction* **140**: 113–121.
- Wu, G. & Morris, S.M. Jr. 1998 Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* **336** (Pt 1): 1-17.

## Y

- Yajima, M., Kanno, T. & Yajima, T. 2006 A chemically derived milk substitute that is compatible with mouse milk for artificial rearing of mouse pups. *Exp. Anim.* **55**: 391–397.
- Yasuda, M., Tanizawa, K., Misono, H., Toyama, S. & Soda, K. 1981 Properties of crystalline L-ornithine: alpha-ketoglutarate delta-aminotransferase from *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.* **148**: 43–50.
- Yoshimatsu, H., Egawa, M. & Bray, G.A. 1993 Sympathetic nerve activity after discrete hypothalamic injections of L-glutamate. *Brain Res.* **601** (1-2): 121-128.

Yu, H., Yoo, P.K., Aguirre, C.C., Tsoa, R.W., Kern, R.M., Grody, W.W., Cederbaum, S.D. & Iyer, R.K. 2003 Widespread expression of arginase I in mouse tissues: Biochemical and physiological implications. *J. Histochem. Cytochem.* **51**: 1151–1160.

# ANNEXE

# Underestimated contribution of skeletal muscle in ornithine metabolism during mouse postnatal development

Benjamin Ladeux<sup>1,2</sup>, Claude Duchamp<sup>2</sup> and Olivier Levillain<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université Lyon 1, Lyon, France ;

<sup>2</sup> Université de Lyon ; Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés ; Université Lyon 1 ; Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat ; Centre National de la Recherche Scientifique ; Villeurbanne, France.

Running title: OAT in mouse tissues

Corresponding Author : Pr Claude Duchamp ; Université de Lyon ; UMR5023 Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés ; Université Lyon 1 ; ENTPE ; CNRS ; 6 rue Raphaël Dubois, 69622, Villeurbanne, France

Tel : 00 33 4 7244 8138 - fax : 00 33 4 7243 1172 - email : [claudeduchamp@univ-lyon1.fr](mailto:claudeduchamp@univ-lyon1.fr)

## ABSTRACT

Ornithine aminotransferase (L-ornithine 2-oxoacid aminotransferase, OAT) is widely expressed in organs, but studies in mice have focused primarily on the intestine, kidney and liver because of the high OAT-specific activity in these tissues.

This study aimed to investigate OAT activity in adult mouse tissues to assess the potential contribution to ornithine metabolism and to determine OAT control during postnatal development.

OAT activity was widely distributed in mouse tissues. Sexual dimorphism was observed for most tissues in adults, with greater activity in females than in males. The contribution of skeletal muscles to total OAT activity (34% in males and 27% in females) was the greatest (50%) of the investigated tissues in pre-weaned mice and was similar to that of the liver in adults. OAT activity was found to be regulated in a tissue-specific manner during post-natal development in parallel with large changes in the plasma testosterone and corticosterone levels. After weaning, OAT activity markedly increased in the liver but dropped in the skeletal muscle and adipose tissue. Anticipating weaning for 3 days led to an earlier reduction of OAT activity in skeletal muscles. Orchidectomy in adults decreased OAT activity in the liver but increased it in skeletal muscle and adipose tissue.

We concluded that the contribution of skeletal muscle to mouse ornithine metabolism may have been underestimated. The regulation of OAT in skeletal muscles differs from that in the liver. The present findings suggest important and tissue-specific metabolic roles for OAT during postnatal development in mice.

Key words: orchidectomy; testosterone; liver; skeletal muscle; weaning; post-natal

## Introduction

In addition to their role as the building blocks of proteins and polypeptides, amino acids regulate key cellular processes and metabolic pathways that are necessary for maintenance, growth, reproduction and immunity (review in Wu et al. 2009). Among them, glutamate and proline are of interest because of their implication in cellular communication, the extracellular matrix and neoglucogenesis (Kim et al. 2007; Wu et al. 2013). These amino acids can be formed through the catalytic activity of ornithine aminotransferase (L-ornithine 2-oxoacid aminotransferase, OAT, EC 2.6.1.13), an enzyme that is widely expressed throughout all kingdoms (bacteria, fungi, plants and animals) (Scher and Vogel 1957; Lu and Mazelis 1975; Nada et al. 2010) and links the production of amino acids to synthesise proteins and glucose to produce energy. L-ornithine, the substrate of OAT, is indeed known to play a pivotal role in several metabolic pathways as a precursor for L-proline, L-glutamate, L-glutamine, L-citrulline and L-arginine biosynthesis.

OAT catalyses the reversible transamination of L-ornithine with  $\alpha$ -ketoglutarate leading to the production of one molecule of glutamate and one molecule of glutamate- $\gamma$ -semialdehyde, which is spontaneously converted into  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate (Fig. 1). The latter molecule can be metabolised further into a second molecule of glutamate or a molecule of proline. In the reverse direction, the transamination of glutamate with  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate to produce L-ornithine and  $\alpha$ -ketoglutarate is catalysed by OAT. In that way, OAT represents an anaplerotic reaction that can replenish components of the Krebs cycle by synthesising  $\alpha$ -ketoglutarate through the transamination of glutamate (Boutry et al. 2012; Yao et al. 2012; Wu et al. 2013).

OAT is expressed in many tissues in rats (Herzfeld and Knox 1968; Herzfeld and Raper 1976; Alonso and Rubio 1989; Kumar et al. 2009) but functionally, the reversible reaction catalysed by OAT is rather specialised for ornithine synthesis in the intestine and for ornithine catabolism in other organs (Alonso and Rubio, 1989; Matsuzawa et al. 1994). OAT expression has been less widely studied in mouse tissues, with studies focusing only on the liver, kidney and intestine (Lim et al. 1998; Yu et al. 2003; Levillain et al. 2005; Levillain et al. 2007; Ventura et al. 2009) that exhibited the highest specific OAT activities. Other tissues have not been studied. This relative disinterest could be misleading, as the low specific activity in large tissues could result in a higher contribution to whole body ornithine metabolism.

During peri-natal development, OAT plays an essential role because the absence of OAT expression in mice is lethal shortly after birth (Wang et al. 1995). Because lethality can be rescued through short-term arginine supplementation (Wang et al. 1995), it was postulated that arginine, an essential amino acid in young mammals (Wu et al. 2009; 2013), cannot be synthesised from ornithine in the gut of OAT<sup>-/-</sup> mice. Therefore, the availability of arginine to the hepatic urea cycle and tissue synthesis of proteins and nitric oxide is reduced (Kerwin and Heller 1994; Wang et al. 1995). The modulation of OAT activity to produce or spare arginine would therefore be of utmost importance in the early postnatal period when arginine availability is rather limited due to its small quantity in mother's milk and when insufficient endogenous synthesis occurs to fulfil the arginine requirements and achieve maximal growth (Vissek 1986; Davies et al. 1993; Reyes et al. 1994; Cynober and Coudray-Lucas 1995). The postnatal ontogenic changes in the liver and kidney OAT expression have already been investigated and results showed a gradual increase within the first weeks of life in rats and mice, but large changes at puberty with the onset of sexual hormone



secretion (Herzfeld and Knox 1968; Volpe et al. 1969; Levillain et al. 2007). 17 $\beta$ -Estradiol is known to upregulate OAT expression in the rat kidney (Herzfeld and Knox 1968; Lyons and Pitot 1977; Mueckler and Pitot 1983; Mueckler et al. 1984; Levillain et al. 2004), while testosterone downregulates OAT expression in the mouse kidney (Levillain et al. 2005). However, the ontogenic profile of OAT activity in the liver and kidney does not apply to all tissues. For instance, intestinal OAT activity was very high at birth but markedly reduced at weaning (Wang et al. 1995). Because no information on OAT expression in other tissues is available during mouse postnatal development, it cannot be inferred that the ontogenic pattern and endocrine regulation is similar in all tissues.

The aim of this study was i) to investigate OAT expression and activity in a variety of mouse tissues in order to determine their respective potential contribution to ornithine catabolism, and ii) to analyze OAT activity during postnatal development in different mouse tissues and investigate potential regulatory factors.

## **Materials and methods**

### *Animals*

In a first series of experiments, adult male (35-40 g) and female (30-32 g) Swiss mice obtained from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) were used. Animals were given free access to tap water and standard laboratory food (2018 Teklad Global, 18% Protein Rodent Diet, Harlan, Gannat, France).

In a second series of experiments, adult male and female Swiss mice from Janvier were mated (1 male for 2 females). As soon as the first signs of pregnancy were observed, females were reared in individual boxes. Due to the high protein need during gestation and lactation (Millican et al. 1987), females were given free access to tap water and a protein-enriched diet (20% Protein SPPS, Safe, Vénissieux, France). Pups were killed at postnatal days 5, 10, 15, 18, 20, 22, 25, 27, 30, 35, 40 and 45. Pups were classically weaned at postnatal day 21, but in a parallel experiment, some pups were weaned earlier at postnatal day 18 (anticipated weaning) and killed at 19, 20 or 21 days old. After removal from their mother, pups were given free access to standard laboratory food. To minimise the potential influence of different genetic backgrounds, reproducers were from the same line used in other experiments, and pups from different litters were used to constitute age-groups. The number of pups per litter was normalised to 9 soon after birth and a total of 24 litters was used.

In a third series of experiments, adult male Swiss mice from Janvier were bought either intact or castrated and killed 18 days after surgery.

All animals were housed in a controlled environment maintained at  $25 \pm 1$  °C and 45% humidity with a 12-h dark cycle (lights on at 7h00). Animal care complied with French regulations for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes and with European Community regulations (Council of Europe N°123, Strasbourg, 1985). The authors were given authorisation by the “Direction Départementale de la Protection du Patrimoine” (n° 69-33 and 69266391) and the local Animal Care Committee to use animals for these experiments (protocol n° BH 2009-15).

### *Tissue sampling*

Mice were anesthetised (i.p.) using 0.1 mL / 30 g BW of pentobarbital sodium (Nembutal 6%, Clin Midy, Paris, France) that was diluted 1:4 in 0.9% NaCl solution for pups and diluted 1:2 for adult mice. After laparotomy, blood

was collected from the abdominal aorta, stored on ice during the rest of the dissection and then centrifuged for 15 min at 21,000 g to collect plasma. The abdominal aorta was cut to remove the blood from all tissues. The following organs were rapidly harvested: liver, heart, white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue (BAT), skeletal muscles (*gastrocnemius*, *biceps surae*, *quadriceps femoris*), whole intestine, testes, ovaries and the brain subdivided into three portions: 1) hemispheres, septum, thalamus, hypothalamus, hippocampus; 2) cerebellum, midbrain; and 3) brainstem. To simplify the terminology, the term “hemisphere” was used for the first subdivision, and the term “cerebellum” was used for the second subdivision. Pieces of intestine were also sampled along the digestive tract. Tissues were weighed rapidly and frozen in liquid nitrogen. Plasma and tissues were kept at -80 °C.

#### *Determination of tissue OAT activity*

To determine OAT activity, tissues were homogenised at 4 °C with a Turrax homogeniser in a buffer composed of 0.33 M sucrose, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, and 0.5% Triton X-100 (pH 7). Homogenates were frozen/thawed three times and centrifuged at 21,000 g for 10 min at 4 °C. OAT activity was determined as previously described (Peraino and Pitot 1963; Herzfeld and Knox 1968). Briefly, supernatants were incubated with a buffer composed of 75 mM potassium phosphate pH 7.5, 20 mM L-ornithine, 0.45 mM pyridoxal phosphate, 5 mM  $\alpha$ -aminobenzaldehyde, and 3.75 mM  $\alpha$ -keto-glutarate at 37 °C in a dark room. Blanks were free of  $\alpha$ -keto-glutarate. The reaction was stopped by adding 40% trichloroacetic acid (TCA). Samples were centrifuged at 21,000 g for 3 min at 4 °C, and absorbance was measured on the clear supernatant at 440 nm on a Hitachi U-1100 spectrophotometer (Meylan, France). The specificity of the reaction catalysed by OAT was verified by the addition of gabaculine (100  $\mu$ M final), a specific inhibitor of OAT (Jung and Seiler 1978) that strongly inhibits the enzymatic reaction in tissue extracts (83-98%). The protein concentration of tissue supernatants was determined using the Bradford method.

#### *Biochemical characteristics of OAT*

The OAT kinetic parameters were determined by measuring the initial speed of reaction at increasing concentrations of ornithine (0, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 and 20 mM) and a fixed  $\alpha$ -keto-glutarate concentration. Kinetic parameters ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) were determined by the direct linear plot of Eisenthal Cornish-Bowden (Eisenthal and Cornish-Bowden 1974).  $K_m$  was expressed in mM and  $V_{max}$  was expressed in nmol pyrroline-5-carboxylate (P5C) per minute per mg soluble protein.

#### *Determination of corticosterone and testosterone plasma concentrations*

The corticosterone concentration was determined by radioimmunoassay (RIA) (Filipski et al. 2002). Testosterone was measured by RIA after extraction by an organic solvent and partition chromatography of the plasma samples (Déchaud et al. 1989)

#### *Calculations and statistical analyses*

OAT activity was expressed in nmol pyrroline-5-carboxylate (P5C) per minute per mg soluble protein, in nmol P5C per min per mg tissue, or in nmol P5C per min per organ using the molar extinction coefficient of P5C (Herzfeld and Knox 1968). The results were expressed as the mean  $\pm$  SE. Multiple comparisons were made using an ANOVA with the Bonferroni Dunnnett test when appropriate. Comparisons between the means were made using Student's *t*-test or the Mann-Whitney U test. A significance level of 95% was used. Statistical analyses were performed using the software Statview.

## Results

### *OAT activity in adult male and female tissues*

OAT activity was detected in all investigated tissues. When expressed in I.U. (nmol P5C / min / mg prot), the highest OAT activity was observed in the intestine (Fig. 2a). OAT activity was lower in the kidney, liver, ovary and heart and much lower in other tissues. As expected, much higher hepatic and renal OAT activities were observed in females than in males. A similar sexual dimorphism was also observed in the skeletal muscle, WAT and brain stem ( $P < 0.05$  to  $0.002$ ), but not in the intestine. Given that the protein concentration differed between male and female tissues, OAT activity was expressed in nmol P5C / min / mg tissue (Fig. 2b). Using this expression, the intestine was still the tissue with the highest OAT activity, followed by the kidneys, liver, heart and ovary, while other tissues had a much lower activity. Sexual dimorphism of OAT activity was still observed in this unit for a number of tissues, including the intestine ( $P < 0.05$ ). Because of the differences in the tissue masses, the total OAT activity per organ was calculated to estimate the individual potential contribution to animal ornithine metabolism (Fig. 2c). The total OAT activity of these 11 organs was 3725 nmol P5C / min in females and only 3113 nmol P5C / min in males. In females, the liver was the main potential contributor to animal ornithine metabolism (34% of total P5C production), followed by skeletal muscles (27%), kidney (21%) and intestine (10%). The contribution of the other organs was very weak (4% to 0.2% of the total). In males, skeletal muscles and liver were the main contributors to ornithine metabolism in almost equal proportions (34% and 32% of P5C production in muscles and liver, respectively), while the intestine contribution was lower (15%) and the kidney contribution to ornithine metabolism was weak (9%). Other male tissues contributed little to the total OAT activity (4% to 0.3%). Sexual dimorphism in favour of females was still observed per organ in the kidney, liver and WAT ( $P < 0.05$  to  $0.002$ ).

### *OAT activity in male and female mouse tissues during postnatal development*

Based on their relative high potential contribution to total OAT activity in adulthood, liver, skeletal muscles and white adipose tissue were further investigated during postnatal development. Hepatic OAT activity, as expressed per mg protein (Fig. 3a), varied with age and sex (ANOVA 2,  $F_{\text{age}} = 67$   $F_{\text{sex}} = 55$ ,  $P < 0.0001$ ). OAT activity in the male and female liver slowly rose between 5 and 20 days of age (+100%,  $F = 21$  in males and 16 in females,  $P < 0.001$ ). Between 20 and 25 days of age (i.e., around the time of weaning), OAT activity markedly increased and then plateaued by 45 days of age at 2.6 times (males) and 3.2 times (females) higher than before weaning (Bonferroni Dunnett test, J20 vs J45,  $P < 0.0001$ ). Sexual dimorphism of hepatic OAT activity in favour of the female appeared from 22 days of age. WAT OAT activity during postnatal development also varied with age and sex (ANOVA 2,  $F_{\text{sex}} = 47.1$ ,  $F_{\text{age}} = 122$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 3b). WAT OAT activity in both males and females was high and stable from postnatal day 5 to day 27 and no differences between sexes were observed. At 27 days of age, OAT activity suddenly dropped and was 2.2-fold (males) and 3-fold (females) lower at 45 days of age (Bonferroni Dunnett test, d27 vs d45,  $P < 0.0001$ ). A sexual dimorphism in favour of females appeared at day 30 (Student's *t*-test, male vs female,  $P < 0.003$ ). Postnatal changes in skeletal muscle OAT activity differed from that in liver (Fig. 3c). OAT activity in both males and females gradually increased after birth and peaked by day 20 (+75 and +117% in males and females, respectively,  $P < 0.001$ ). After weaning, muscle OAT activity markedly dropped, and the values were 3.6-fold (males) and 3-fold (females) lower at 45 than at 20 days of age. From 35 days of age, sexual dimorphism in favour of females was observed (Mann-Whitney U test, male vs female,  $P < 0.03$ ).

Because tissue OAT activity markedly changed during postnatal development, total OAT activity was calculated at 20 days of age, i.e., just before weaning. By 20 days of age, the skeletal muscles showed the highest total OAT activity and contributed to 50% of the potential ornithine catabolism of the 10 organs studied (Fig. 4). The potential contributions of the liver and kidney (25% and 9% of total, respectively) to total OAT activity were lower. The potential contributions of other tissues were very weak.

#### *Plasma testosterone and corticosterone levels during postnatal development*

The plasma testosterone concentration was very low during the first 25 days of life and then rose slowly from day 25 to 35 (Fig. 5), where it peaked. The plasma corticosterone concentration was very low during the first 10 days of life and then rose markedly to peak at 18 days of age (Fig. 5). Weaning was associated with a drop in corticosterone that stabilised by 30 days of age to levels that were lower in males than in females ( $53 \pm 1$  vs  $85 \pm 2$  ng / mL;  $P < 0.05$ ).

#### *Effect of orchidectomy on OAT activity*

Among the potential factors controlling the postnatal ontogeny of OAT in liver, WAT and skeletal muscles, sexual maturation occurring at puberty (between 25 to 30 days of age in mice) was of primary interest. A group of 45-day-old males were surgically orchidectomised and killed 18 days after surgery, a period sufficient to reduce endogenous testosterone to undetectable levels (Lin et al. 2010). Orchidectomy (Fig. 6) significantly reduced OAT activity in the liver (-31%,  $P < 0.008$ ) but increased that in WAT (+182%,  $P < 0.0001$ ) and skeletal muscles (+38%,  $P < 0.0001$ ). Orchidectomy restored WAT OAT activity to the level measured before puberty and increased skeletal muscle OAT activity to the level measured in adult female mice.

#### *Effect of early weaning on liver and muscle OAT activity*

Because our results indicated marked postnatal changes in tissue OAT activity associated with the weaning period, we investigated whether weaning precocity influenced liver and skeletal muscle OAT activity by weaning pups at the age of 18 days instead of 21 days (Fig. 7). The results indicated that anticipated weaning did not affect male or female liver OAT activity during this ontogenic period. In contrast, in both males and females, anticipating the time of weaning induced a temporal shift in the drop of muscle OAT activity that occurred earlier in mice weaned at 18 days than in those weaned at 21 days of age (Fig. 7). This protocol did not significantly affect body weight of growing pups.

#### *OAT kinetic parameters in adult mouse organs*

The different responses of OAT within tissues prompted us to investigate the potential expression of various OAT isoenzymes with different biochemical characteristics between tissues. The  $K_m$  and  $V_{max}$  values of OAT were determined in the liver, WAT and skeletal muscles of adult mice using the Eisenthal Cornish-Bowden representation and are summarised in Table 1. The results showed a significant ( $P < 0.0001$ ) effect of both gender and tissue on  $K_m$  and  $V_{max}$  values. The male liver and WAT  $K_m$  values were similar and were significantly lower than the muscle  $K_m$  values. In females, the  $K_m$  values were higher than in males and similar between tissues. The  $V_{max}$  values measured in tissues of male or female mice were in accordance with the activities determined above (Fig. 2) and confirmed a sexual dimorphism.

## **Discussion**

The present paper described the relative expression of OAT in male and female mouse tissues and showed tissue-specific regulations of OAT activity by age, orchidectomy and nutrition.

#### *Unexpected contribution of skeletal muscle in OAT metabolism*

The present data confirmed the wide distribution of OAT activity in all the mouse tissues studied, which is in agreement with the OAT expression cartography described in mice (Yu et al. 2003) and in rats (Herzfeld and Knox 1968; Mueckler and Pitot 1983). As classically observed, specific OAT activity per g protein or tissue was the highest in the intestine, followed by the kidney and liver (e.g., Herzfeld and Knox 1968). However, because of tissue mass, the contribution of skeletal muscle to total animal OAT activity was similar to that of the liver in adult mice. In pre-weaned mice, the skeletal muscles were the main contributor (50%) of the potential ornithine catabolism of the 10 organs studied. The present study emphasised the importance of the unit to compare OAT activity between tissues and indicated that some tissues might have been underestimated in their potential contribution to animal OAT catabolism. This finding could be of importance in physiological situations where arginine may be limited, such as during postnatal development or when energy metabolism is stimulated.

#### *Tissue-specific ontogenic profiles of OAT activity in mice, endocrine and nutritional regulation*

Postnatal changes in OAT activity were tissue-specific and occurred during the pre-, peri- and post-weaning periods. In the pre-weaning period, the increase in liver and skeletal muscle OAT activity paralleled the changes in plasma corticosterone levels (Fig. 3 and 5), suggesting a role for corticosterone in OAT expression. Thyroid hormones might also be involved because of the postnatal increase in 3,5,3'-triiodo-L-thyronine ( $T_3$ ) plasma levels (Hadj-Sahraoui et al. 2000) and the positive role exerted by  $T_3$  on OAT expression (Shull et al. 1995). The postnatal development of hepatic OAT was already suggested to be primarily controlled by glucocorticoids and potentiated by thyroxine (Vandewater and Hennin 1985).

In the post-weaning period, the large increase in OAT activity in the liver and the decrease in WAT and skeletal muscles occurred in parallel with the onset of testosterone secretion in males, suggesting the direct control of OAT expression by sexual steroids in mice. This finding is in keeping with data in rats showing a link between the large post-weaning rise in liver OAT (Herzfeld and Greengard 1969; Volpe et al. 1969) and the onset of sexual hormone secretion (Levillain et al. 2007; Wu et al. 2010). The potential role of testosterone in the ontogenic profile of OAT in male mice was further supported by the changes in tissue OAT activity following orchidectomy, where liver OAT activity was downregulated (-31%), skeletal muscle activity was upregulated (+31%) and adipose tissue was upregulated (+180%). The present results contrast the lack of effect of testosterone injections on mouse liver OAT (Bulfield and Hall 1989), but the suppression of endogenous testosterone by orchidectomy might be more efficient than the addition of exogenous testosterone to modify hepatic OAT activity. A negative regulation of OAT by testosterone was already reported in the mouse kidney (Manteuffel-Cymborowska et al. 1995; Levillain et al. 2005; Levillain et al. 2007, 2011), and the present data extend these findings to skeletal muscle and WAT. The molecular basis of this tissue-specific regulation of OAT activity is unclear. It is not known whether this regulation relies on different isoenzymic forms in these tissues. The existence of distinct OAT isoenzymes is not supported by observations that hepatic, renal and intestinal OATs, which may undergo divergent responses to various stimuli, share similar physico-chemical, immunochemical and kinetic properties (Sanada et al. 1970; Herzfeld and Raper 1976) or molecular coding sequences (Kobayashi et al. 1989). Differences in  $K_m$  between 2 and 4 mM in rat kidney and liver, respectively, were used to support the existence of different isoenzymes (Volpe et al. 1974). The present data on OAT biochemical characteristics showed small differences in the  $K_m$  between tissues, similar to those

observed between sexes for a given tissue. Furthermore, because the liver and WAT, which exhibited similar  $K_{ms}$ , evolved differently with orchidectomy, it follows that biochemical characteristics could not be used as predictors of the existence of different isoforms with distinct tissue regulation. Interestingly, the higher OAT activity found in the female liver, WAT and skeletal muscles was associated with a lower affinity of the enzyme (Table 1), possibly in relation to aggregation of OAT monomers when OAT expression is increased (Boernke et al. 1981) leading to reduced affinity of the enzyme to its substrates to spare ornithine for use by the urea cycle. Alternatively, the contrasted transcriptional regulation by testosterone might possibly be related to potential differences in tissue co-regulator proteins that are known to affect the transcriptional activity of androgen receptors (Heinlein and Chang 2002) rather than to the differential regulation of still uncharacterised distinct isoenzymes. Estrogens that positively regulate OAT (Herzfeld and Knox 1968; Wu 1979; Mueckler and Pitot 1983) might also be involved in the post-weaning increase in tissue OAT activity, thus leading to the marked sexual dimorphism in OAT activity observed in most tissues (6 of 11) of adult mice, as found in earlier mouse (Levillain et al. 2005; Levillain et al. 2007; Ventura et al. 2009) and rat studies (Herzfeld and Knox 1968).

Weaning by itself was associated with changes in tissue OAT activity in both males and females. This was observed before puberty, i.e., before the onset of sexual steroid secretion, and may thus involve food transition from weaning. The experimental anticipation of weaning by 3 days induced an early decrease in muscle OAT activity, indicating that skeletal muscle OAT activity was modulated by the transition from a milk diet, rich in lipids (22%) and relatively poor in proteins (11%) (Meier et al. 1965; Yajima et al. 2006), to a diet composed of pellets rich in proteins (18%). The slight decrease in muscle OAT activity observed in normally weaned pups occurred slightly before the pups were actually weaned (between 20 and 21 days). This finding might be related to the observation that pups already eat pellets by 20 days of age, as assessed by traces of pellets in their stomachs. However, liver OAT was not affected by the rise in protein intake induced by early weaning, in contrast with the results of other studies, showing that the protein content of the food modulates rat hepatic OAT activity (Brennan et al. 1970; Mueckler et al. 1983; Matsuzawa et al. 1994; Boon et al. 1999). It could be argued that a very high protein enrichment (up to 70% of diet) was used to upregulate hepatic OAT activity compared to a diet low (5%) in proteins. It follows that skeletal muscle OAT was very sensitive to changes in food proteins in young, rapidly growing animals. The higher protein intake after weaning may contribute, at least in part, to the ontogenic drop in muscle OAT and the rise in hepatic OAT activity that were observed in both males and females; however, the molecular basis of such contrasting effects remains to be explored.

#### *Potential physiological significance of a high skeletal muscle OAT activity in pre-weaned mice*

The physiological role of OAT in liver, WAT and skeletal muscles during postnatal development is still unclear, but the total activity of these tissues by 20 days of age was far from negligible. Despite its low levels during the first 3 postnatal weeks, hepatic OAT could contribute to i) the synthesis of glutamate coupled to glutamine synthesis to eliminate the ammonia that is not by the urea cycle and ii) the production of glutamate for hepatic neoglucogenesis (Mallette et al. 1969) to fuel intense pup growth. In skeletal muscles, the gradual postnatal increase might also provide energy substrates to mitochondria to fuel increased postnatal muscle contractile activity. However, if the enzyme functions in the degradation of ornithine to generate glutamine, the high level of OAT activity in skeletal muscle and its gradual postnatal increase are puzzling at a time when arginine, the substrate of arginases that fuel OAT with ornithine (Fig. 1), is rather limited because of the low amount of arginine in mother's milk and because of possibly insufficient endogenous synthesis for maximal growth (Visek 1986; Reyes et al. 1994; Cynober and Coudray-Lucas 1995). Therefore, it could be postulated that before weaning, the



flux in muscle OAT reactions might be in the direction of ornithine synthesis rather than degradation (see Fig. 1). The reaction requires glutamate and proline, which are the major amino acids of mouse milk (Meier et al. 1965). This would spare arginine for use in other processes and in producing ornithine and  $\alpha$ -ketoglutarate. Muscle ornithine could fuel ornithine decarboxylase to form polyamines that are potent activators of skeletal muscle growth and development (Lee and Maclean 2011).  $\alpha$ -Ketoglutarate could fuel the increased energetic activity and play a role in stimulating cell growth and metabolism (Duran et al. 2012; Yao et al. 2012). As a deamination process, OAT could therefore contribute glutamate into the Krebs cycle in skeletal muscles of pre-weaned mice to fuel energy needs and promote cell growth. After weaning, when arginine is no longer limited, high muscle OAT activity is required and OAT activity drops. In males, secreted testosterone can negatively regulate muscle OAT (present data) but positively regulate ornithine decarboxylase (Lee et al. 2011), thereby further contributing to polyamine production, myoblast proliferation and skeletal muscle growth. Further studies are required to confirm this stimulating hypothesis.

In conclusion, the present data indicated that OAT activity is widely detected in mouse tissues and that a sexual dimorphism is observed for most tissues in adults. Previous studies may have underestimated the contribution of some tissues, such as skeletal muscles, to whole body ornithine metabolism. OAT activity was found to be regulated in a tissue-specific manner during mouse postnatal development in relation to several modulating factors, including sexual steroids, corticosterone and nutrition. These findings suggest important and tissue-specific metabolic roles of OAT during postnatal development in mice.

## Acknowledgements

This work was funded by the CNRS and the University of Lyon. BL was in receipt of a fellowship from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Alonso E, Rubio V (1989) Participation of ornithine aminotransferase in the synthesis and catabolism of ornithine in mice. Studies using gabaculine and arginine deprivation. *Biochem J* 259:131-138
- Boernke WE, Stevens FJ, Peraino C (1981) Effects of self-association of ornithine aminotransferase on its physicochemical characteristics. *Biochemistry* 20:115-121
- Boon L, Geerts WJ, Jonker A et al (1999) High protein diet induces pericentral glutamate dehydrogenase and ornithine aminotransferase to provide sufficient glutamate for pericentral detoxification of ammonia in rat liver lobules. *Histochem Cell Biol* 111:445-452
- Boutry C, Matsumoto H, Bos C et al (2012) Decreased glutamate, glutamine and citrulline concentrations in plasma and muscle in endotoxemia cannot be reversed by glutamate or glutamine supplementation: a primary intestinal defect? *Amino Acids* 43:1485-1498
- Brennan PC, Peraino C, Fry RJM, Swick RW (1970) Immunofluorescent localization of ornithine aminotransferase in rat liver. *J Histochem Cytochem* 18:264-267
- Bulfield G, Hall JM (1981) Ornithine aminotranferase levels in rats and mice differ in their response to oestrogen and testosterone. *Comp Biochem Physiol Part B: Comp Biochem*, 69:295-297
- Cynober L, Coudray-Lucas C (1995) Urinary urea nitrogen prediction of total urinary nitrogen. *J Parenter Enteral Nutr* 19(2):174
- Davis TA, Fiorotto ML, Reeds PJ (1993) Amino acid compositions of body and milk protein change during the suckling period in rats. *J Nutr* 123:947-956
- Déchaud H, Lejeune H, Garoscio-Cholet M et al (1989) Radioimmunoassay of testosterone not bound to sex-steroid-binding protein in plasma. *Clin Chem* 35:1609-1614

- Durán RV, Oppliger W, Robitaille AM et al (2012) Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling. *Mol Cell* 47:349-58
- Eisenthal R, Cornish-Bowden A (1974) The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem J* 139:715-720
- Filipski E, King VM, Li XM et al (2002) Host Circadian Clock as a Control Point in Tumor Progression. *J Natl Cancer Institute*, 94:690-697
- Hadj-Sahraoui N, Seugnet I, Ghorbel MT, Demeneix B (2000) Hypothyroidism prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. *Neurosci Lett* 280:79-82
- Heinlein CA, Chang C (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 16:2181-2187
- Herzfeld A, Knox WE (1968) The properties, developmental formation, and estrogen induction of ornithine aminotransferase in rat tissues. *J Biol Chem* 243:3327-3332
- Herzfeld A, Raper SM (1976) Enzymes of ornithine metabolism in adult and developing rat intestine. *Biochim Biophys Acta* 428:600-610
- Jung MJ, Seiler N (1978) Enzyme-activated irreversible inhibitors of L-ornithine:2-oxoacid aminotransferase. Demonstration of mechanistic features of the inhibition of ornithine aminotransferase by 4-aminohex-5-ynoic acid and gabaculine and correlation with in vivo activity. *J Biol Chem* 253:7431-7439
- Kerwin JF Jr, Heller M (1994) The arginine-nitric oxide pathway: a target for new drugs. *Med Res Rev* 14:23-74
- Kim SW, Mateo RD, Yin YL, Wu GY (2007) Functional amino acids and fatty acids for enhancing production performance of sows and piglets. *Asian- Australasian J Animal Sci* 20: 295-306
- Kobayashi T, Nishii M, Takagi Y et al (1989) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of mRNA for human kidney ornithine aminotransferase. An examination of ornithine aminotransferase isozymes between liver and kidney. *FEBS Lett* 255:300-304
- Kumar H, Ananda S, Devaraju KS et al (2009) A sensitive assay for ornithine amino transferase in rat brain mitochondria by ninhydrin method. *Indian J Clin Biochem* 24:275-279
- Lee NK, MacLean HE (2011) Polyamines, androgens, and skeletal muscle hypertrophy. *J Cell Physiol* 226:1453-1460
- Lee NK, Skinner JP, Zajac JD, Maclean HE (2011) Ornithine decarboxylase is upregulated by the androgen receptor in skeletal muscle and regulates myoblast proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E172-E179
- Levillain O, Hus-Citharel A, Garvi S et al (2004) Ornithine Metabolism in Male and Female Rat Kidney: Mitochondrial expression of ornithine aminotransferase and arginase II. *Am J Physiol Renal physiol* 286:F727-F738
- Levillain O, Diaz JJ, Blanchard O, Déchaud H (2005) Testosterone down-regulates ornithine aminotransferase gene and up-regulates arginase II and ornithine decarboxylase genes for polyamines synthesis in the murine kidney. *Endocrinology* 146:950-959
- Levillain O, Ventura G, Déchaud H et al (2007) Sex-differential expression of ornithine aminotransferase in the mouse kidney. *Am J Physiol Renal physiol* 292:F1016-F1027
- Levillain O, Dégletagne C, Letexier D, Déchaud H (2011) Orchidectomy Upregulates While Testosterone Treatment Downregulates the Expression of Ornithine Aminotransferase Gene in the Mouse Kidney. In Akin F (ed) *Basic and Clinical Endocrinology Up-to-Date*, Book 3, pp115-132
- Lim SN, Rho HW, Park JW et al (1998) A variant of ornithine aminotransferase from mouse small intestine. *Exp Mol Med* 30:131-135
- Lin CY, Lin MT, Cheng RT, Chen SH (2010) Testosterone Depletion by Castration May Protect Mice from Heat-Induced Multiple Organ Damage and Lethality. *J Biomed Biotechnol* 2010 doi:10.1155/2010/485306
- Lu TS, Mazelis M (1975) l-Ornithine:2-oxoacid aminotransferase from squash (*Cucurbita pepo*, L.) Cotyledons. *Plant Physiol* 55:502-506
- Lyons RT, Pitot HC (1977) Hormonal regulation of ornithine aminotransferase biosynthesis in rat liver and kidney. *Arch Biochem Biophys* 180:472-479
- Mallette LE, Exton JH, Park CR (1969) Control of Gluconeogenesis from Amino Acids in the Perfused Rat Liver. *J Biol Chem* 244:5713-5723
- Manteuffel-Cymborowska M, Chmurzyńska W, Peska M, Grzelakowska-Sztabert B (1995) Arginine and ornithine metabolizing enzymes in testosterone-induced hypertrophic mouse kidney. *Int J Biochem Cell Biol* 27:287-295
- Matsuzawa T, Kobayashi T, Tashiro K, Kasahara M (1994) Changes in ornithine metabolic enzymes induced by dietary protein in small intestine and liver: intestine-liver relationship in ornithine supply to liver. *J Biochem* 116:721-727



- Meier H, Hoag WG, McBurney JJ (1965) Chemical characterization of inbred-strain mouse milk. I. Gross composition and amino acid analysis. *J Nutr* 85:305-308
- Millican PE, Vernon RG, Pain VM (1987) Protein metabolism in the mouse during pregnancy and lactation. *Biochem J* 248:251-257
- Mueckler MM, Merrill MJ, Pitot HC (1983) Translational and pretranslational control of ornithine aminotransferase synthesis in rat liver. *J Biol Chem* 258:6109-6114
- Mueckler MM, Moran S, Pitot HC (1984) Transcriptional control of ornithine aminotransferase synthesis in rat kidney by estrogen and thyroid hormone. *J Biol Chem* 259:2302-2305
- Mueckler MM, Pitot HC (1983) Regulation of ornithine aminotransferase mRNA levels in rat kidney by estrogen and thyroid hormone. *J Biol Chem* 258:1781-1784
- Nada AMK, Abd-Elhalim HM, El-Domyati FM et al (2010) Expression, detection of candidate function and homology modeling for *Vicia villosa* ornithine  $\delta$ -aminotransferase. *GM Crops* 1:250-256
- Peraino C, Pitot HC (1963) Ornithine- $\delta$ -transaminase in the rat I. Assay and some general properties. *Biochim. Biophys Acta* 73:222-231
- Reyes AA, Karl IE, Klahr S (1994) Role of arginine in health and in renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 267:F331-F346
- Sanada Y, Suemori I, Katunuma N (1970) Properties of ornithine aminotransferase from rat liver, kidney and small intestine. *Biochim Biophys Acta* 220:42-50
- Scher WI, Vogel HJ (1957) Occurrence of ornithine  $\delta$ -transaminase: a dichotomy. *Proc Natl Acad Sci.* 43:796-803
- Shull JD, Pennington KL, Gurr JA, Ross AC (1995) Cell-type specific interactions between retinoic acid and thyroid hormone in the regulation of expression of the gene encoding ornithine aminotransferase. *Endocrinology* 136:2120-2126
- Vandewater LJ, Henning SJ (1985) Role of thyroxine in the postnatal development of rat hepatic tryptophan oxygenase and ornithine aminotransferase. *Proc Soc Exp Biol Med* 179:83-89
- Ventura G, De Bandt JP, Segaud F et al (2009) Overexpression of ornithine aminotransferase: consequences on amino acid homeostasis. *Br J Nutr* 101:843-851
- Visek WJ (1986) Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J Nutr* 116(1):36-46
- Volpe P, Sawamura R, Strecker HJ (1969) Control of ornithine  $\delta$ -transaminase in rat liver and kidney. *J Biol Chem* 244:719-726
- Volpe P, Menna T, Pagano G (1974) Ornithine- $\delta$ -transaminase heterogeneity and regulation. *Eur J Biochem* 44:455-458
- Wang T, Lawler AM, Steel G et al (1995) Mice lacking ornithine-delta-aminotransferase have paradoxical neonatal hypoorithinaemia and retinal degeneration. *Nat Genet* 11:185-190
- Wu C (1979) Estrogen receptor translocation and ornithine aminotransferase induction by estradiol in rat kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 89:769-776
- Wu G, Bazer FW, Davis TA et al (2009) Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino acids* 37:153-168
- Wu X, Arumugam R, Zhang N, Lee MM (2010) Androgen profiles during pubertal Leydig cell development in mice. *Reproduction* 140:113-121
- Wu G, Wu Z, Dai Z et al (2013) Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” By animals and humans. *Amino Acids* 44:1107-1113
- Yajima M, Kanno T, Yajima T (2006) A chemically derived milk substitute that is compatible with mouse milk for artificial rearing of mouse pups. *Exp Anim* 55:391-397
- Yao K, Yin Y, Li X et al (2012) Alpha-ketoglutarate inhibits glutamine degradation and enhances protein synthesis in intestinal porcine epithelial cells. *Amino acids* 42:2491-2500
- Yu H, Yoo PK, Aguirre CC et al (2003) Widespread expression of arginase I in mouse tissues: biochemical and physiological implications. *J Histochem Cytochem* 51:1151-1160

## Figure Legends

**Fig. 1 Simplified metabolism of ornithine.** 1: Arginase II; 2: Ornithine aminotransferase (OAT); 3: spontaneous conversion; 4: Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase; 5: Pyrroline-5-carboxylate synthase; 6: Glutamate dehydrogenase; 7: Pyrroline-5-carboxylate reductase; 8: Glutamine synthase; 9: Glutaminase; 10: Carbamyl-phosphate synthase I; 11: Ornithine carbamyltransferase; 12: Argininosuccinate synthase; 13: Argininosuccinase; 14: Arginase I; 15: Ornithine decarboxylase; 16: Spermidine synthase; 17: Spermine synthase; 18: proline oxidase. Dotted lines: amino acids exchanges.

**Fig. 2 OAT activity in adult male and female mouse tissues.** OAT activity was measured in kidney (K), liver (L), skeletal muscle (*gastrocnemius*) (M), heart (H), white adipose tissue (W), brown adipose tissue (B), hemispheres (He), cerebellum (Ce), brainstem (Br), testis (T) and ovaries (O). a) OAT activity expressed in nmol P5C / min / mg prot; b) OAT activity expressed in nmol P5C / min / mg tissue; c) Total OAT activity per organ expressed in nmol P5C / min / tissue. For the total activity in skeletal muscles, data from average values determined in the *biceps surae*, *gastrocnemius* and *quadriceps femoris* were extrapolated to whole body muscle mass (45% of body mass in males and 40% in females). Solid bars: males, open bars: females. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE,  $n = 9$  mice for each tissue and sex. Significant differences were tested using the Mann-Whitney U test. Male vs female: \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.002$ .

**Fig. 3 OAT activity in male or female liver, white adipose tissue and skeletal muscle (*gastrocnemius*) during postnatal development.** Black square: male, open circle: female. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE,  $n = 6$  mice for each tissue, age and sex. Significant differences were tested using an ANOVA followed by the Bonferroni Dunnett test and Student's  $t$ -test. Male vs female: \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ . Error bars that are not visible were covered by the symbols.

**Fig. 4 Total tissue OAT activity in male or female mice at 20 days of age.** Activity is expressed in nmol P5C / min / tissue. Activity was analysed in kidney (K), liver (L), skeletal muscle (M, data extrapolated to whole body muscle mass from average values determined in *biceps surae*, *gastrocnemius* and *quadriceps femoris*), heart (H), white adipose tissue (W), brown adipose tissue (B), hemispheres (He), cerebellum (C), brainstem (Br), testis (T) and ovaries (O). Black bars: male, open bars: female. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE,  $n = 9$  mice. Significant differences were tested using the Mann-Whitney U test. Male vs female: \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.002$ .

**Fig. 5 Plasma testosterone and corticosterone levels during postnatal development.** Black bars or black squares: males; open circles: females. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE;  $n = 6$  to 13. Significant differences were tested using an ANOVA and the Mann-Whitney U tests. Male vs female: \*  $P < 0.05$ . Error bars that are not visible were covered by the symbols.

**Fig. 6 Effect of orchidectomy on OAT activity in liver, white adipose tissue (WAT) and skeletal muscle (*gastrocnemius*) of adult male mice.** Black bars: control mice; hatched bars: orchidectomised mice. Mice were killed 18 days after orchidectomy. The results are expressed as the mean  $\pm$  SE;  $n = 8$ . Significant differences were tested using Student's  $t$ -test. Control vs orchidectomy: \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$ .

**Fig. 7 Effect of anticipated weaning on tissue OAT activity and body weight in male or female mice during postnatal development.** Black squares: males; open circles: females. Solid line: control mice (weaned at 21 days of

age, solid arrow); dotted line and hatched symbols: anticipated wean (weaned mice at 18 days of age, dot arrow). The results are expressed as the mean  $\pm$  SE;  $n = 6$ . Significant differences were tested using an ANOVA and Mann-Whitney U tests. Control *vs* anticipated wean: \*  $P < 0.05$ . Error bars that are not visible were covered by the symbols.

**Table 1** OAT kinetic parameters in tissues of adult mice

		Males	Females	P value
<hr/>				
$V_{\max}$				
	Liver	$7.70 \pm 0.06$	$9.98 \pm 0.15$	0.049
	White adipose tissue	$3.01 \pm 0.02$	$4.63 \pm 0.06$	0.014
	<i>Gastrocnemius</i> muscle	$2.33 \pm 0.11$	$2.80 \pm 0.12$	0.014
<hr/>				
$K_m$				
	Liver	$2.79 \pm 0.04$	$4.94 \pm 0.17$	0.049
	White adipose tissue	$2.36 \pm 0.08$	$5.49 \pm 0.04$	0.014
	<i>Gastrocnemius</i> muscle	$4.24 \pm 0.04$	$4.51 \pm 0.29$	0.027
<hr/>				

Values were determined by the Eisenthal Cornish-Bowden representation and are expressed in mM of ornithine for  $K_m$  and nmol pyrroline-5-carboxylate (P5C) per minute per mg soluble proteins for  $V_{\max}$ . The results are expressed as mean  $\pm$  SE;  $n = 5$ . Statistical differences between males and females were tested using Mann-Whitney U-tests.

Fig. 1

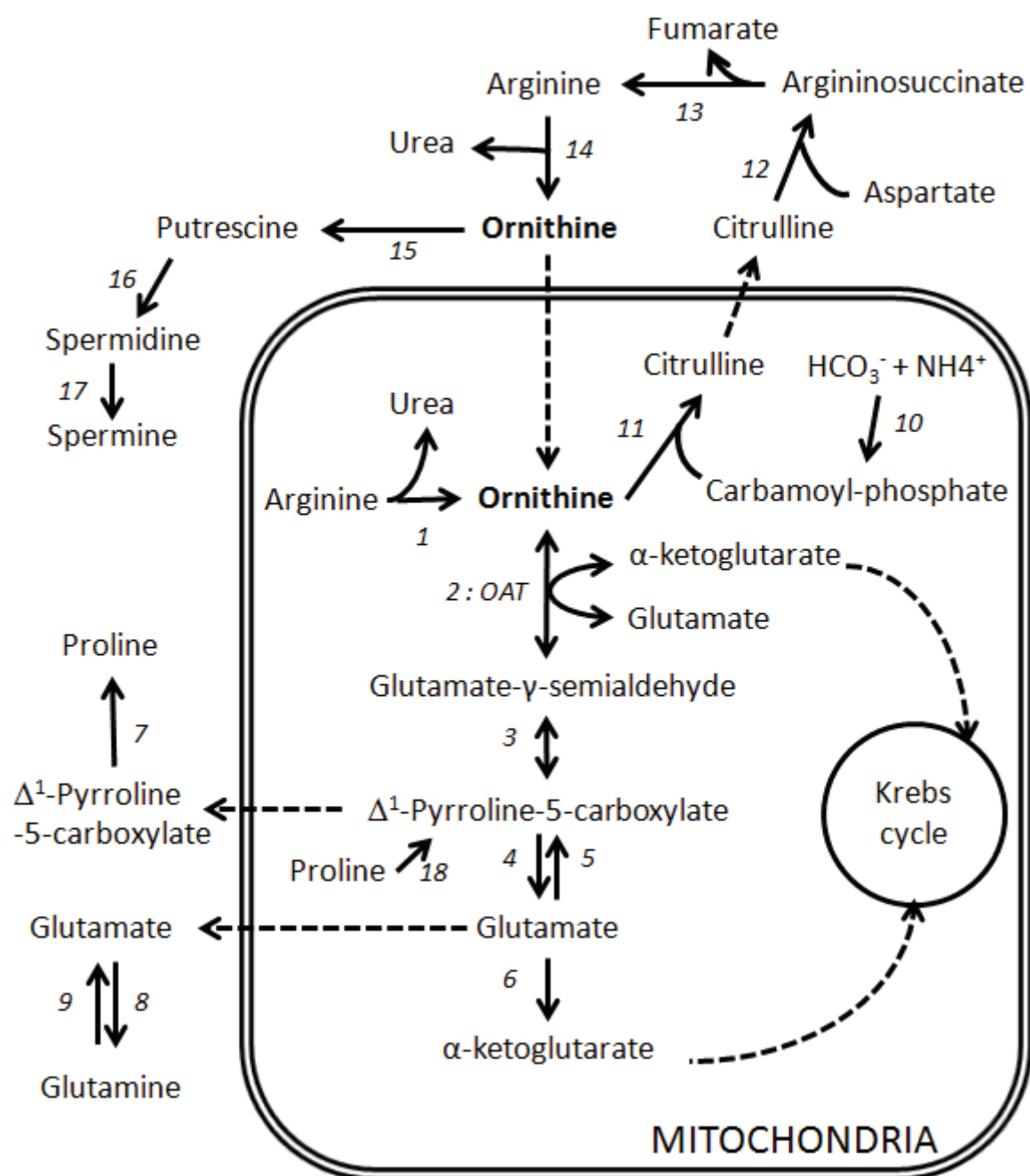


Fig. 2

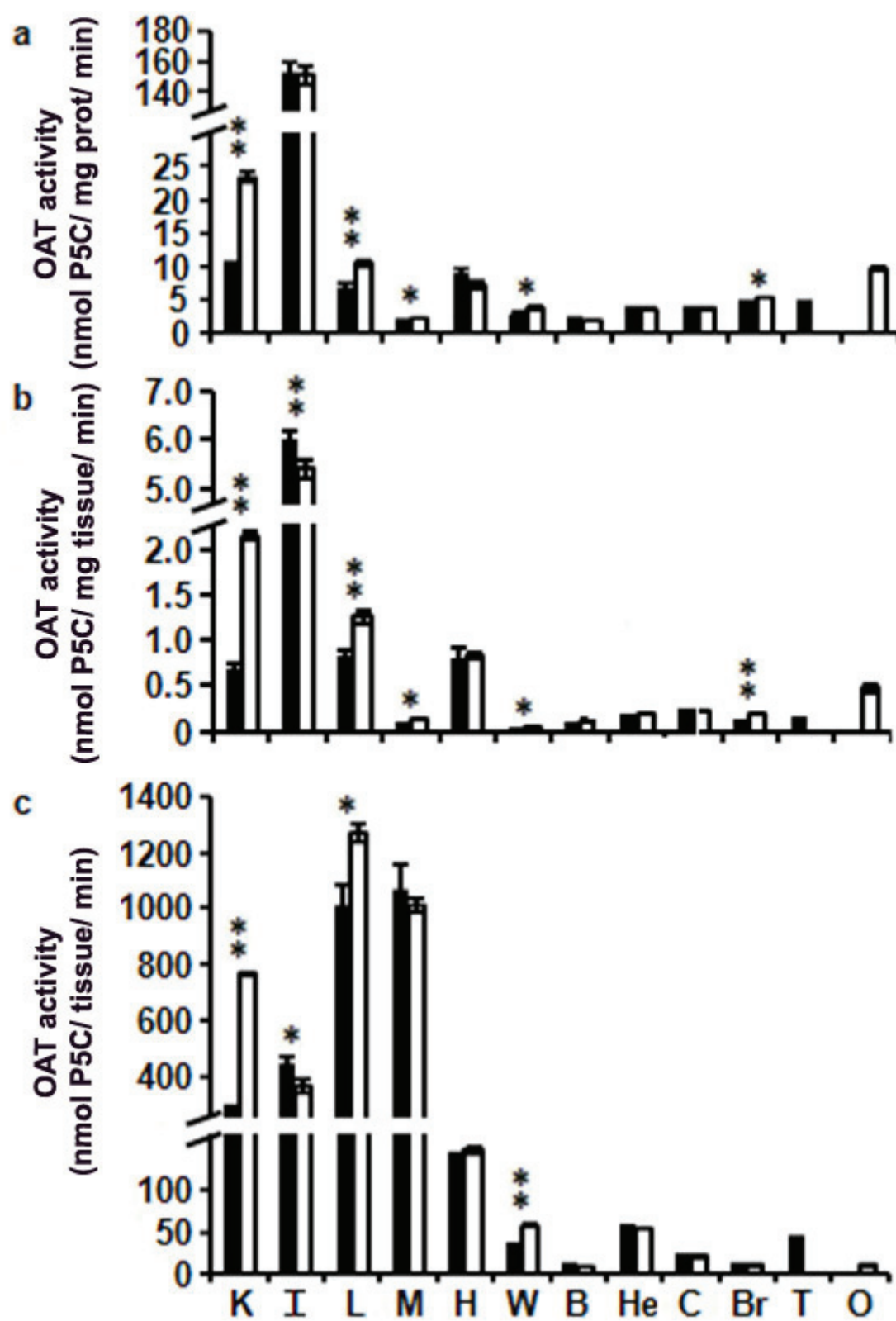


Fig. 3

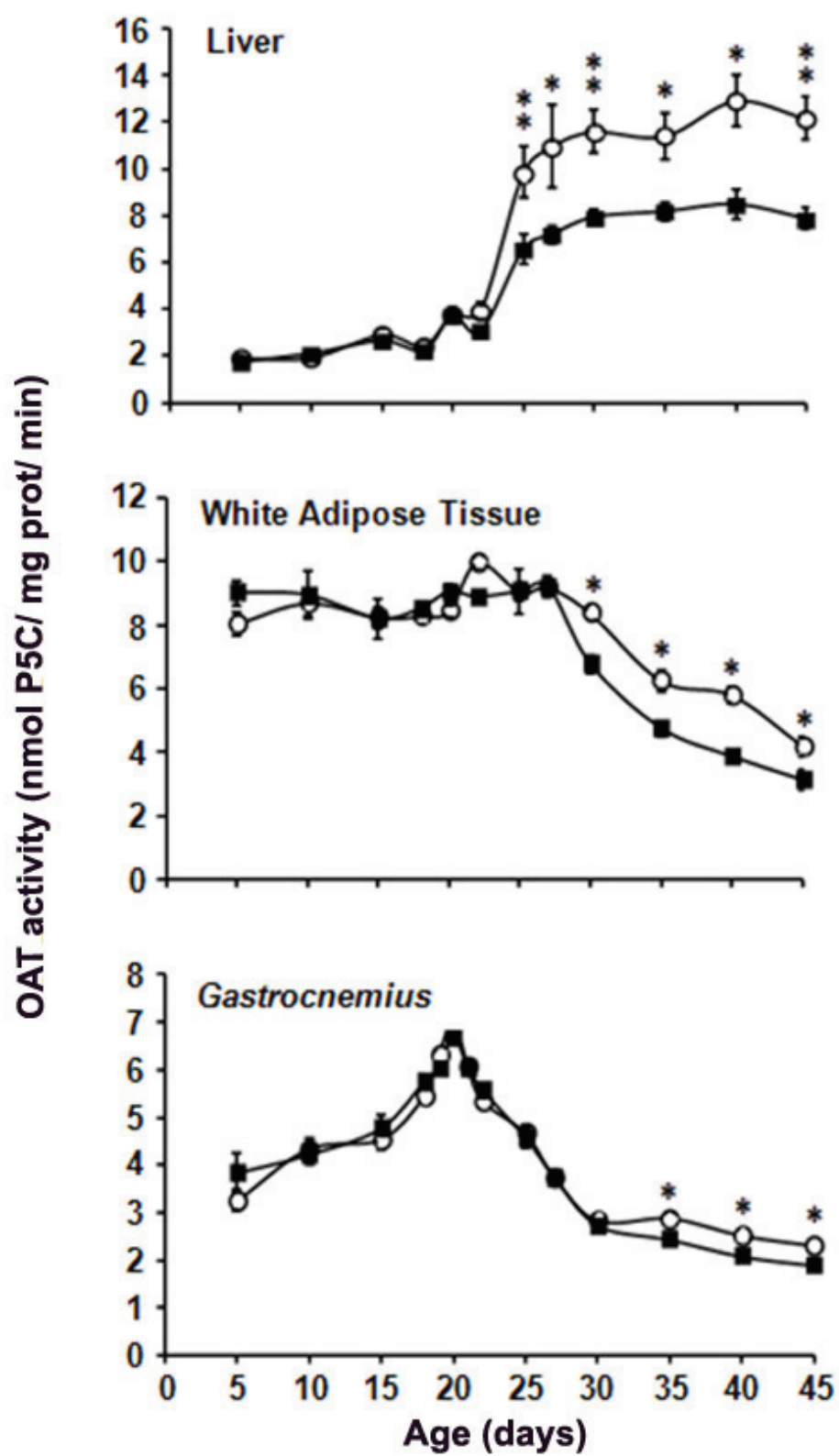




Fig. 4

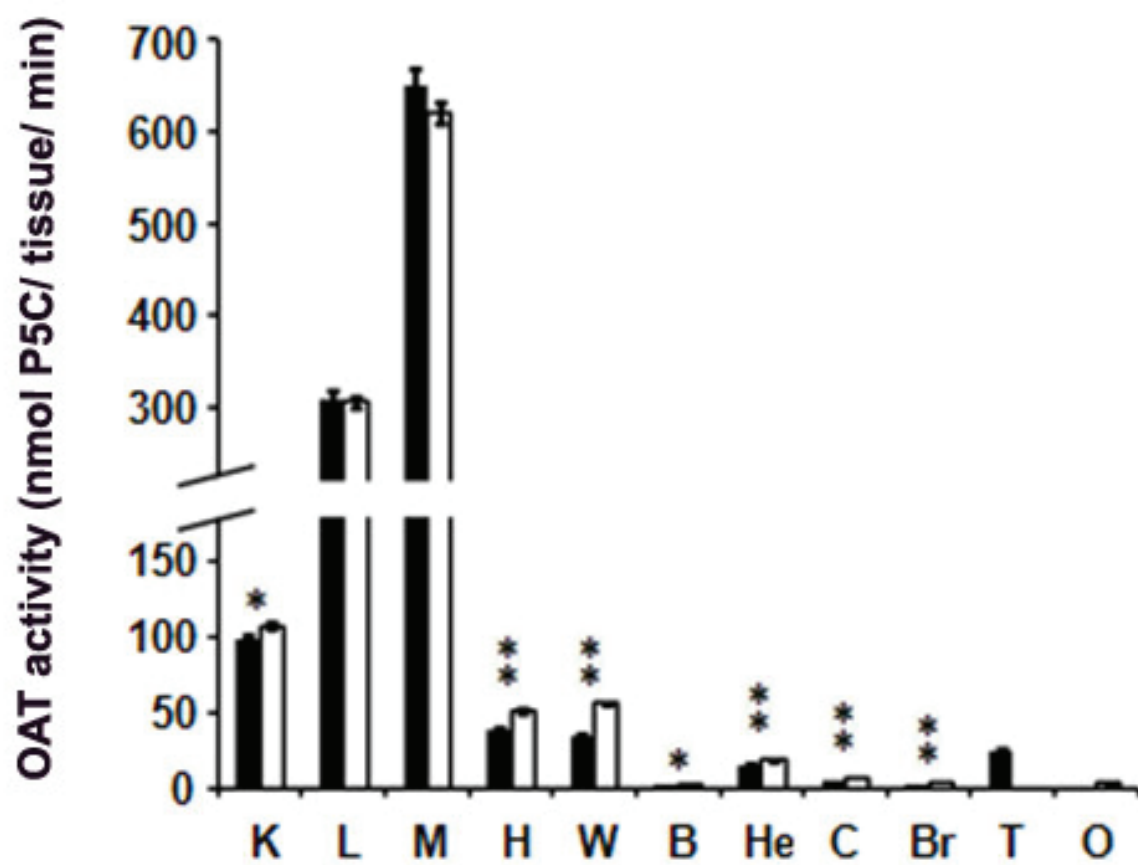


Fig. 5

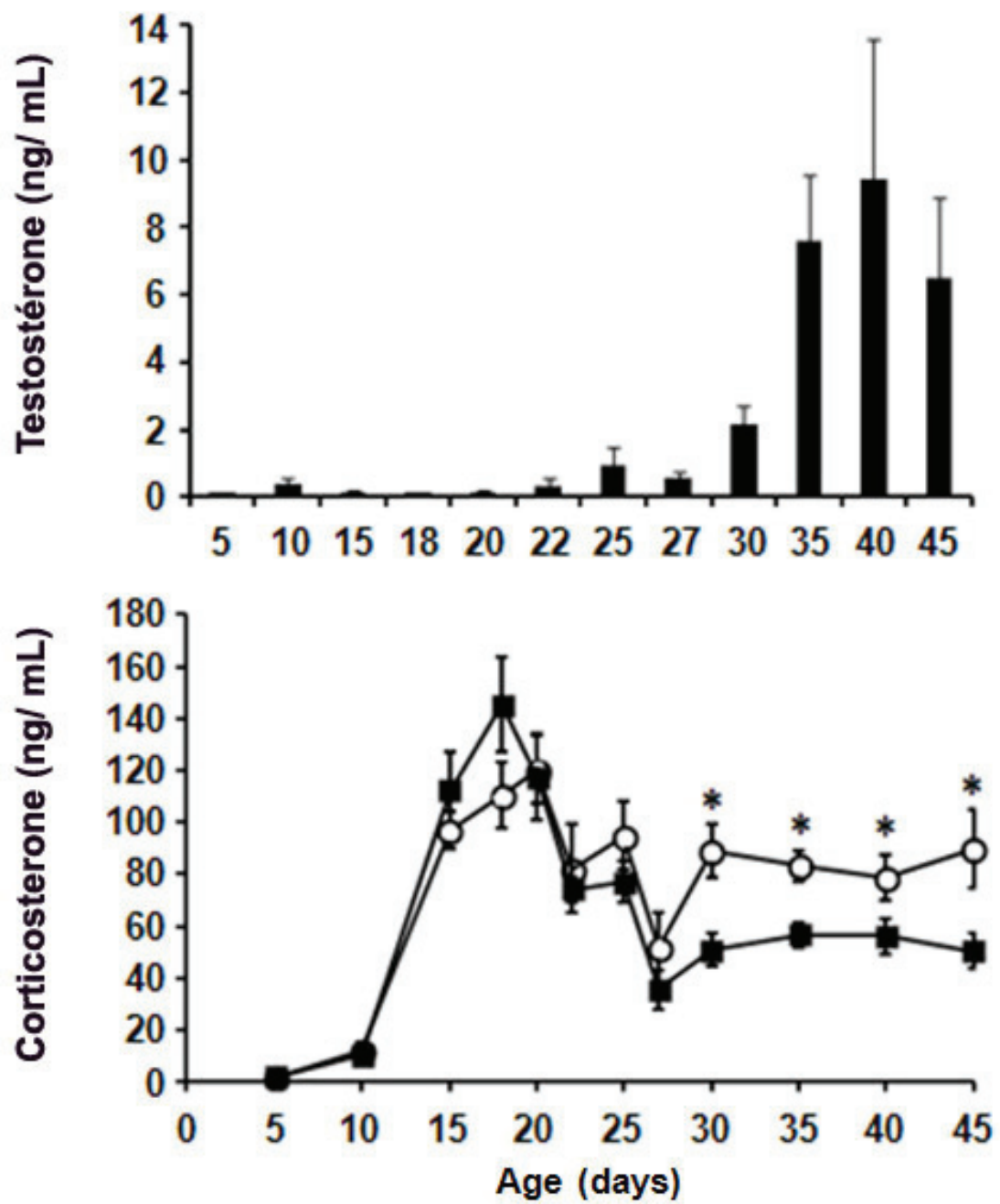


Fig. 6

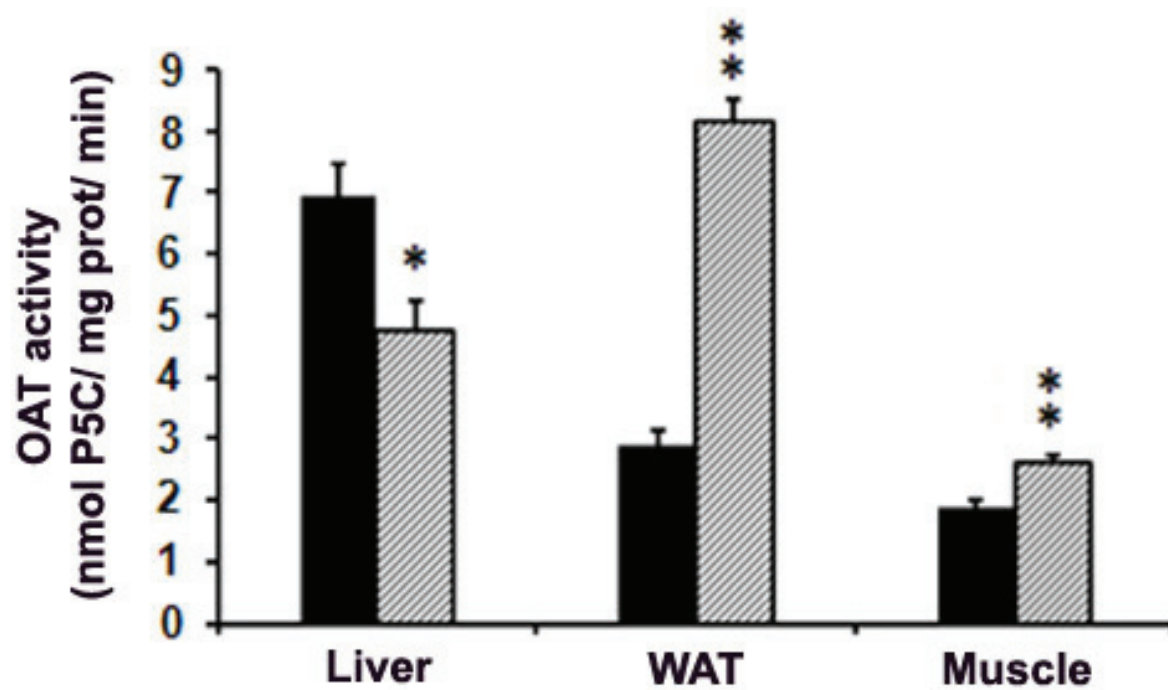


Fig. 7

